Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen
und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Brüster)

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMIE UND PHYSIOLOGIE DER HEPARINE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Karl-Heinz Klasing

1982

UNIV.
LEIDEN

Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen
und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Brüster)

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHEMIE UND PHYSIOLOGIE DER HEPARINE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Karl-Heinz Klasing

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universitä
Düsseldorf.

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Trobisch
Korreferent
gez.: Priv.-Doz. Dr. Richter

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Hämostase	1
1.2.	Inhibitoren der Blutgerinnung	4
1.3.	AT III - molekularer Aufbau und Funktion	6
1.4.	Aufbau und Funktion des Heparins	8
2.	MATERIAL	14
3.	METHODEN	2o
4.	ERGEBNISSE	45
4.1.	Physikochemische Untersuchungen der Heparine	45
4.2.	Metachromasie-Versuch	54
4.3.	Ergebnisse der "klassischen" gerinnungsphysiologischen Untersuchungen	6o
4.4.	Voruntersuchungen zur Ermittlung der pH- und Pufferoptima	68
4.5.	Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen FXa, AT III und Heparin mittels S2222	76
4.6.	Quantitativer Heparintest mittels Coatest	9o
4.6.1.	Untersuchung verschiedener Heparinfraktionen	94
4.6.2.	Untersuchung verschiedener kommerzieller Heparine	98
5.	DISKUSSION	1o1
6.	ZUSAMMENFASSUNG	115
7.	LITERATURVERZEICHNIS	119

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0011

1. EINLEITUNG

Eine der wichtigsten Eigenschaften des Blutes ist, daß es gerinnen und sich wieder verflüssigen kann. Gerinnung und Fibrinolyse werden enzymatisch reguliert. Beide Systeme passen sich den jeweils herrschenden physiologischen Bedingungen perfekt an. Damit dies möglich ist, existieren sowohl Aktivatoren als auch Inhibitoren, die dafür sorgen, daß jedes System, entsprechend dem aktuellen Bedarf, funktioniert und so verhindern, daß ein System über sein Ziel hinausschießt, was fatale Folgen für den Organismus hätte. Die ineinandergreifenden Mechanismen der Gerinnung und der Fibrinolyse sind heute weitgehend aufgeklärt, sowohl was die Aktivatoren, als auch was die Inhibitoren betrifft. Zum Verständnis der Problematik ist im folgenden das Prinzip der Hämostase nach dem heutigen Wissensstand wiedergegeben.

1.1. Hämostase

An der Hämostase sind insgesamt 3 Systeme beteiligt (4)

- die Gefäße
- die Thrombocyten
- die plasmatischen Gerinnungsfaktoren

UNIV. LEIDEN BIBL.

Die Blutgerinnung, an der insgesamt 12 Gerinnungsfaktoren beteiligt sind, ist somit nur ein Teil der Hämostase. Diese Gerinnungsfaktoren werden, entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung, mit römischen Ziffern gekennzeichnet:

Faktor I	=	Fibrinogen
Faktor II	=	Prothrombin
Faktor III	=	Gewebsthromboplastin
Faktor IV	=	Calciumionen
Faktor V	=	Accelerin
Faktor VII	=	Proconvertin
Faktor VIII	=	Antihämophiles Globulin A
Faktor IX	=	Christmas-Faktor
Faktor X	=	Stuart-Prower-Faktor
Faktor XI	=	Plasma-Thromboplastin Antecedent
Faktor XII	=	Hageman-Faktor
Faktor XIII	=	Fibrinstabilisierender Faktor

Den Endpunkt der Blutgerinnung stellt die Fibrinbildung dar. Dieser Vorgang kann auf 2 verschiedenen Wegen eingeleitet werden, die beide zur Aktivierung des Faktor X und damit zur Bildung des Prothrombinaktivators führen.
Man unterscheidet das sogenannte exogene vom endogenen System.

1.1.1. Exogenes Gerinnungssystem (Abb.1)

Gewebsverletzungen führen zur Freisetzung von zellulären Inhaltsstoffen mit gerinnungsfördernder Aktivität. Diese Inhaltsstoffe entsprechen dem Gewebsthromboplastin (F.III). Mit dem strömenden Blut gelangt gleichzeigtig Faktor VII (F.VII) in die Wunde. Die Aktivierung des F.VII erfolgt durch Kontakt mit F.VIII. Aktivierter F.VII (F.VIIa) aktiviert nun seinerseits in Gegenwart von Calciumionen und Phospholipiden (PL) Faktor X (F.X). Die Aktivierung von F.X ist der erste Schritt in der Gerinnungskaskade, den beide Systeme gemeinsam haben.

1.1.2. Endogenes Gerinnungssystem (Abb.1)

Durch Kontakt mit unphysiologischer Oberfläche, die im Bereich von Gefäßläsionen vorhanden ist, wird Faktor XII (F.XII) aktiviert. Die Bildung des F.X-Aktivators verläuft zunächst über die Aktivierung der Faktoren XI und IX. Aktivierter F.X ist eine Serinprotease, die mit Calciumionen, Phospholipiden (PL) und F.V den sogenannten Prothrombinaktivator bildet. Dieser spaltet den F.II an 4 speziellen Arginylgruppen, dabei werden, neben Peptiden, Thrombin freigesetzt.

Der letzte Schritt der Gerinnungskaskade ist die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrinmonomere, die durch Thrombin enzymatisch katalysiert wird. Diese Fibrinmonomere werden anschließend unter Einwirkung des durch Thrombin aktivierten F.XIII vernetzt. Damit ist die Gerinnung abgeschlossen.

1.2. Inhibitoren der Blutgerinnung

Die Blutgerinnung wird von Inhibitoren gesteuert, die die Aktivierungsprozesse auf den verschiedenen Stufen der Gerinnungskaskade blockieren können. Diese Inhibitoren werden Antithrombine bezeichnet, weil ihre inhibitorische Wirkung zunächst für Thrombin beobachtet wurde (4). Insgesamt sind im Plasma des Menschen 6 Antithrombine (AT) bekannt (5):

AT I	=	Fibrin
AT II	=	Heparin-Cofaktor
AT III	=	progressives Antithrombin
AT IV	=	Reaktionsprodukt aus der Prothrombinaktivierung (Inhibitor source materal)
AT V	=	Antikörper
AT VI	=	Fibrinogenspaltprodukte

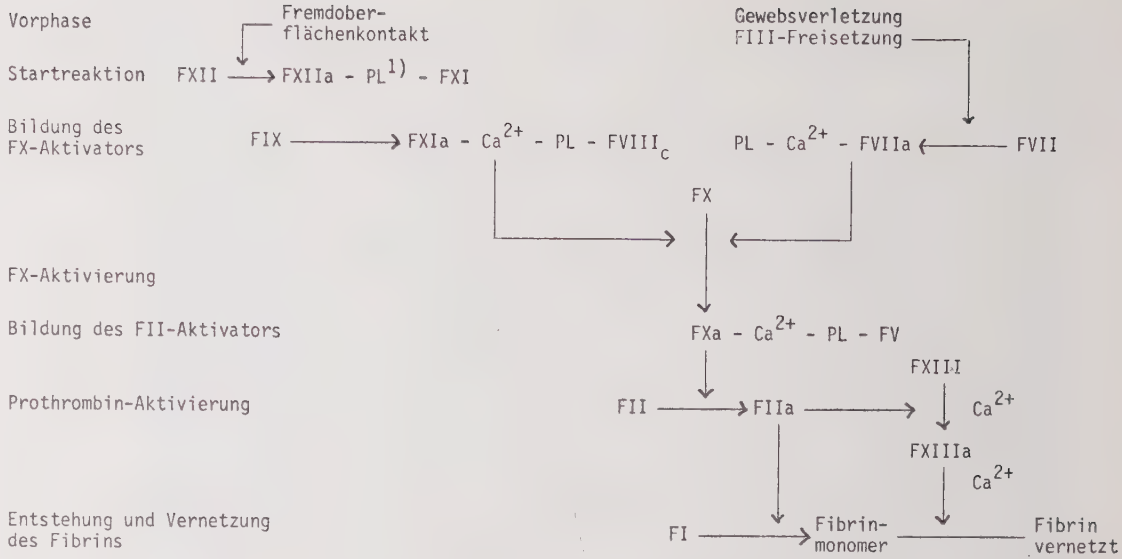


Abb.1: Der Verlauf der Gerinnung (nach HEIMBURGER und TROBISCH (1))
1) PL = Phospholipid

Nur 2 von den 6 Antithrombinen sind jedoch nach neuerer Auffassung echte Thrombininhibitoren. Der potenteste Inhibitor unter allen Antithrombinen ist das AT III (7). Es inhibiert Thrombin, aber auch F.Xa, in einer stark zeitabhängigen Reaktion; daher wird es auch als progressives Antithrombin bezeichnet (5). Setzt man dem Plasma Heparin zu, so erhält man ein rasch wirkendes Antithrombin. SEEGERS gab diesem Antithrombin die Bezeichnung Heparin-Cofaktor (5) und unterscheidet es als selbständiges Protein vom progressiven Antithrombin (5). Erst später konnten die Arbeitsgruppen um ABILDGAARD (6) und HEIMBURGER (7) zeigen, daß der Heparin-Cofaktor und das AT III proteinchemisch identisch sind. Da dem AT III in der vorliegenden Arbeit eine besondere Bedeutung zukommt, sollen seine Funktion und sein Stoffwechsel im folgenden kurz dargestellt werden.

1.3. AT III - molekularer Aufbau und Funktion

Antithrombin III ist ein Glykoprotein, das aus einer einzigen Peptidkette mit einem Molekulargewicht von 58.000 Daltons besteht (1). Es ist aus 425 Aminosäuren

mit 6 Cystinresten aufgebaut (8). Genaue Vorstellungen über die Tertiärstruktur liegen bis heute noch nicht vor. Eine gewisse Vorstellung gibt jedoch das Ballon-Modell von MAGNUSSON (47).
AT III ist in der Lage, mit verschiedenen Proteasen Komplexe zu bilden und sie zu inaktivieren. Es sind die folgenden Proteasen:

- Thrombin
- F.Xa (31,32)
- F.IXa
- F.VIIa ?
- F.XIIa ?
- F.XIa ?
- Trypsin (3o)
- Kallikrein (33,34,35)
- Komplement C_1-Esterase (36)
- Plasmin (37)

Obwohl AT III diese Proteasen in vitro inhibieren kann, spielt wohl nur die Hemmung des Thrombins und des F.Xa eine biologisch bedeutsame Rolle.
Der Mechanismus der Inhibition ist noch nicht eindeutig geklärt. Abb.2 zeigt den Mechanismus der Inhibition nach den heute allgemein anerkannten Vorstellungen.

Die Protease spaltet im AT III-Molekül eine Arg-Val-Bindung. Die dabei freiwerdende Carboxyl-Gruppe des Arginins reagiert mit der Seringruppe im aktiven Zentrum der Protease unter Bildung einer starken Acylbindung (9). Die Frage, ob F.Xa und Thrombin im AT III-Molekül dieselbe Peptidsequenz hydrolysieren, oder ob jede Protease eine spezifische Sequenz hydrolysiert, ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. YIN konnte zeigen, daß, nachdem Thrombin durch AT III neutralisiert wurde, AT III nicht mehr in der Lage war, in einer zweiten Reaktion F.Xa zu neutralisieren (1o). OESTERUD und OSAMO kamen allerdings zu gegenteiligen Ergebnissen (11,12).

1.4. Aufbau und Funktion des Heparins

Heparin ist ein wasserlösliches Mucopolysaccharid, das infolge vielfacher Veresterung mit Schwefelsäure elektronegativ geladen ist. Die Monosaccharidsequenz des -Heparins zeigt den folgenden Aufbau: L-Iduronsäure - N-acetyl D-Glucosamin-6-Sulfat - D-Glucuronsäure - N-Sulfat-Glucosamin-6-Sulfat (Abb.3). Die einzelnen Monosaccharide sind untereinander glykosidisch verknüpft. Je nach Kettenlänge schwankt das Molekulargewicht zwischen 6.ooo und 4o.ooo Daltons.

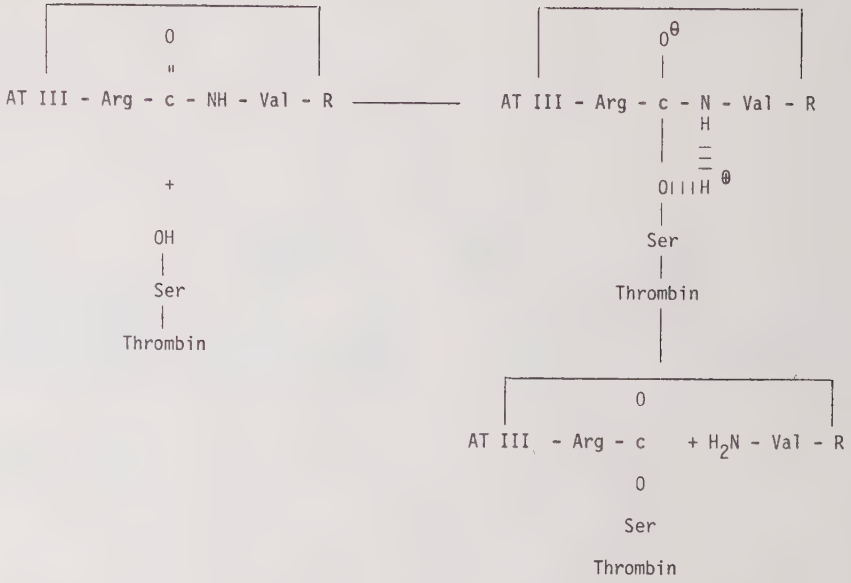


Abb.2: Spaltungsmechanismus durch die Serinprotease Thrombin

Es ist anzumerken, daß die oben beschriebene Sequenz nur eine von vielen möglichen ist; ebenfalls kann der Sulfatierungsgrad schwanken (der Gehalt an Schwefelsäure kann bis zu 4o Gewichtsprozent betragen).
In Anwesenheit von Heparin kann die Inhibition der Serinproteasen Thrombin, F.Xa, F.IXa, F.XIa und F.XIIa durch Antithrombin maximal beschleunigt werden (17,39). Die inhibitorische Wirkung des Heparins ist an die Anwesenheit des AT III gebunden; in seiner Abwesenheit hat Heparin keinerlei hemmenden Effekt auf die Serinproteasen (16). Der Wirkungsmechanismus des Heparins wird heute so erklärt, daß es sich an das AT III-Molekül anlagert und in ihm eine Konformationsänderung bewirkt, so daß die reaktive Argininggruppe im AT III-Molekül für die Anlagerung der Protease leichter zugänglich wird (18). Jedoch ist auch bis heute noch nicht der Wirkungsmechanismus restlos aufgeklärt.
Dem Molekulargewicht kommt für die inhibierende Wirkung eine besondere Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, daß mit abnehmendem Molekulargewicht die Inhibitionspotenz des Heparins zunimmt (13). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von "high-activity" und "low-activity" Heparinen (13).

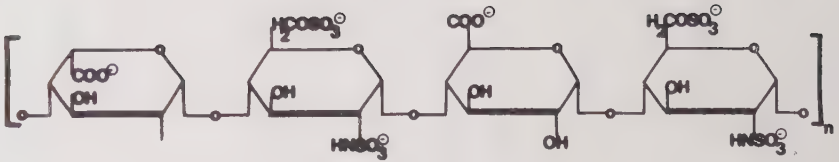


Abb.3: Mögliche Struktur des Heparins (nach ROSENBERG (38))

Ebenfalls hat der Ursprungsort des Heparins für die Inhibitionspotenz eine große Bedeutung. BARROWCLIFF et al. (14) zeigten, daß die anti-Xa-Potenz von Mucosaheparinen größer als die von Lungenheparinen ist. Die Mastzellen stellen das natürliche Reservoir für Heparin im Organismus dar (48). Heparin wird üblicherweise aus Mucosa- oder Lungengewebe gewonnen, da diese Gewebe reich an Mastzellen sind. Seine Aktivität wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben. Dabei entspricht 1 IE der spezifischen Wirkung von 7,7 µg internationalen Standardpräparates (15). Das Standardpräparat (1942) besteht aus dem getrockneten Natriumsalz von Heparin aus Rinderlunge (15). Zur Aktivitätsbestimmung nach USP wird in einem Versuch die kleinste Menge des Heparinstandards bestimmt, welche - in o,8 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst - die Gerinnung von 1 ml Schafplasma nach Zugabe von o,2 ml Calciumchloridlösung innerhalb von 1 Std. verhindern kann. Das zu prüfende Heparin wird nun genau eingewogen und in physiologischer Kochsalzlösung in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die Lösung wird annähernd auf die gleiche Wirkstärke verdünnt wie die

Standardlösung. Vom Standard werden mindestens 4 Verdünnungen hergestellt, die jeweils um 5% differieren sollen. Das gleiche geschieht mit dem zu prüfenden Heparin. Zu o,8 ml jeder Lösung gibt man 1 ml Plasma, fügt o,2 ml Calciumchlorid hinzu und läßt die Röhrchen 1 Std. stehen. Danach wird der Gerinnungsgrad bestimmt, der in 3, subjektiv festgelegten Stufen unterteilt ist. Sie werden mit o,25, o,5, o,75 bezeichnet, begrenzt von den Stufen 1 = totale Gerinnung und 0 = fehlende Gerinnung. Es werden Mehrfachbestimmungen durchgeführt. In einer Tabelle wird neben der Röhrchennummer der Logarithmus des dazugehörigen Standards und der Gerinnungsgrad eingetragen. Ebenso verfährt man mit dem zu prüfenden Heparin. Anschließend wird der Mittelwert des Standards (ms) und der Mittelwert des zu prüfenden Heparins (mv) bestimmt. Der Wert antilog (ms-mv) ergibt nun die Anzahl der IE/mg bzw. IE/ml des zu prüfenden Präparates.

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, die Wechselwirkung des F.Xa mit seinem natürlichen Inhibitor, dem AT III und Heparin, zu untersuchen, mit dem Ziel, kinetische Daten über die Wechselwirkung zu erhalten.

Ergänzend wurden physikochemische Untersuchungen zur Reinheit und zur Qualitätskontrolle von Heparinen durchgeführt. Schließlich soll versucht werden, eine Aktivitätsbestimmung von Heparin auf dem Boden der gewonnenen Erkenntnisse auszuarbeiten.

2. MATERIAL

2.1. Agarose: Indubiose A 37 (Industrie Biologique Francaise, Grennevillier, Frankreich)

2.2. Barbitursäure (Merck, Darmstadt)

2.3. Natriumsalz der Diäthylbarbitursäure (Merck, Darmstadt)

2.4. Natriumacetat (Merck, Darmstadt)

2.5. NaOH 1 N - mindestens 96% - (Merck, Darmstadt)

2.6. HCl 1 N (Merck, Darmstadt)

2.7. Cetavlon (Hexadecyl-trimethylamoniumbromid) (Merck, Darmstadt)

2.8. Toluidin - Blau (Serva, Heidelberg)

2.9. Aceton - mindestens 96% - (Merck, Darmstadt)

2.1o. Färbelösung "stains-all" (4, 5, 4', 5'-dibenzo-3, 3'-diäthyl-9 methylthiacarbocyaninbromid) (Serva, Heidelberg)

2.11. Ampholyte: Ampholine^{R} in verschiedenen pH-Bereichen (LKB Producter, Bromma, Schweden)

2.12. β-Alanin (Serva, Heidelberg)

2.13. Calciumlactat (Merck, Darmstadt)

2.14. Essigsäure - mindestens 99% - (Merck, Darmstadt)

2.15. Coomassine Brilliant Blue (

2.16. ε-aminocapronsäure (Serva, Heidelberg)

2.17. HPMC (Hydroxymethylprolincellulose) (Serva, Heidelberg)

2.18. Calciumchlorid $CaCl_2$ (Merck, Darmstadt)

2.19. Kaolin (Behringwerke, Marburg)

2.2o. Faktor Xa-Rind- (Diagnostic Reagents, Thame, Oxford, England)

2.21. Human AT III (AB Kabi, Stockholm, Schweden)

2.22. S 2222 (Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA)
(AB Kabi, Stockholm, Schweden)

2.23. Thrombin (Hoffmann-La Rocke, Grenzach, Baden)

2.24. Fibrinogen (AB Kabi, Stockholm, Schweden)

2.25. Heparine für die i.v.-Applikation.
Es wurden folgende Präparate verwendet:

- Medac^R (Medac, Hamburg) 5.ooo U/ml,
Chargen Nr.: A63A, A66A, A71A, B74B, B72A, H73A, B6NA, A75A

Heparine:

- Dihydergot^{R} (Sandoz, Basel, Schweiz) 5.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: oo3

- Liquemin^{R} (Hoffmann-La Roche, Grenzach, Baden)
  5.ooo U/ml, Chargen Nr.: G67oS74P

- Braun Melsungen (Braun Melsungen, Melsungen)
  2o.ooo U/ml

- Nordmark (Nordmark, Hamburg) 5.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: 243

- Thrombophob (Nordmark, Hamburg) 5.ooo U/ml

- Thromboliquine (Organon, München) 5.ooo U/ml

- Organon (Organon, München) 5.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: 714973

- Calciparin (Nattermann, Hamburg)
  Chargen Nr.: 251

- Medac (Medac, Hamburg) 2o.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: U72A

- Medac (Medac, Hamburg) 25.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: V72A, X72A, X72B

- Riker 5.ooo (Riker, Bocholt) 5.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: 12617o

- Riker 1o.ooo (Riker, Bocholt) 1o.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: o66266

- Riker 2o.ooo (Riker, Bocholt) 2o.ooo U/ml,
  Chargen Nr.: 153890

- Riker 25.ooo (Riker, Bocholt) 25.ooo U/ml,
  Chargen Nr. o89188

- Riker 4o.ooo (Riker, Bocholt) 4o.ooo U/ml,
  Chargen Nr. 68oo6

2.26. Heparine in Substanz

- Roche-Heparin (Hoffmann-La Roche, Grenzach, Baden)
  Spez. Aktivität = 138 USP/mg, Charge 27o61o

- Mucosaheparin (Riker, Bocholt)
  Spez. Aktivität = 173 USP/mg

2.27. Picrinsäure (Merck, Darmstadt)

2.28. Formamid (Merck, Darmstadt)

2.29. Standardnormalplasma, lyophilisiert
(AB Kabi, Stockholm, Schweden)

2.3o. PTT-Reagenz, lyophilisiert (Behringwerke, Marburg)

2.31. Thrombin 46 I.E. (La Roche, Grenzach, Baden)

2.32. Barbitalpuffer pH = 5,75 (Behringwerke, Marburg)

3. METHODEN

3.1. Elektrophoretische Trennung von Heparin in Agarose-Gel

Prinzip:

In einem Agarose-Gel gleichmäßiger Schichtdicke werden von einer schlitzförmigen Auftragsstelle aus heparinhaltige Proben im elektrischen Feld aufgetrennt. Nach beendeter Trennung werden die Heparine im Gel mit Cetavlon fixiert (2o). Überschüssiges Cetavlon wird in destilliertem Wasser herausgewaschen und das Gel getrocknet. Danach wird die Gelplatte für ca. 4 Std. in Toluidin-Blau-Lösung gefärbt und der überschüssige Farbstoff durch Entfärben mit Essigsäure entfernt.

Methode:

1,5 g Agarose werden in 1oo ml o,1 M Na-Acetatpuffer pH = 5,o gelöst und zum Sieden erhitzt. 3o ml der heißen Lösung werden mit einer Vollpipette gleichmäßig auf eine 1o x 2o cm große Glasplatte aufgetragen. Ca. 1,5 cm vom oberen Rand der Platte entfernt wird eine Gelstanze aufgelegt. Nach erkalten der Lösung wird die Gelstanze wieder entfernt.

Die Gelplatte wird nun sofort in eine Elektrophoresekammer mit Kühltisch (Hersteller: LKB Producter, Bromma, Schweden) gebracht und auf +6°C abgekühlt. Die Pufferkammern werden mit o,1 M Na-Acetatpuffer pH = 5,o gefüllt. Der Kontakt zwischen Gelplatte und Pufferbehälter wird durch bündig geschnittene, in Acetatpuffer getränkte Filterpapierstreifen hergestellt. Mit einer Hamilton-Pipette (Hersteller: Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz) werden 1o µl der 1:1o verdünnten Heparine in die Auftragsschlitze pipettiert. Für 9o Minuten wird nun eine Spannung von 18o V bei einer Stromstärke von 7o mA angelegt. Nach beendeter Elektrophorese wird die noch feuchte Gelplatte in o,1%iger Cetavlonlösung fixiert. Danach wird die Gelplatte mit Filterpapier abgedeckt und im warmen Luftstrom getrocknet. Nach Entfernung des überschüssigen Cetavlons in destilliertem Wasser wird das Gel in Tolnidin-Blau-Lösung (4o mg Tonidin-Blau in 2o ml Wasser unter Zugabe von 8o ml Aceton) ca. 3o Minuten gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wird nach Sicht in o,1%iger Essigsäure entfernt und die Platte an der Luft getrocknet.

Zur Auswertung der Elektrophorese wird zum einen die Anzahl der Banden bestimmt, zum anderen die relative elektrische Mobilität ermittelt.

3.2. Elektrophoretische Auftrennung von Heparinen in Agarose-Gel unter Verwendung von Acetat-Harnstoff-Puffer

Prinzip:

Durch Zugabe von Harnstoff bei der elektrophoretischen Auftrennung ist es möglich, eine Verbesserung der Auftrennung durch Sprengung möglicherweise vorhandener Van-der-Waal'scher oder hydrophober Bindungen zu erzielen.

Methode:

Die Gelplatte wird, wie in Kap. 3.1. beschrieben, hergestellt. Die Pufferbehälter werden mit o,1 M Na-Acetatpuffer pH = 5,o unter Zugabe von 1 M Harnstoff gefüllt. Das weitere Vorgehen entspricht dem in Kap. 3.1.

3.3. Coomassie-Brilliant-Blue^{R} Färbung

Prinzip:

Coomassie färbt spezifisch Proteine blau - Heparine werden nicht gefärbt. Die Methode dient als Nachweis für Proteine, die eventuell in den Heparinpräparaten enthalten sein können.

Methode:

Nach beendeter Elektrophorese (siehe Kap. 3.1.) wird die noch feuchte Gelplatte für 15 Minuten in einer Picrinsäure-Essigsäurelösung (Verhältnis 1:2) fixiert. Danach wird die Gelplatte im warmen Luftstrom getrocknet und überschüssige Picrinsäure unter fließendem Wasser herausgespült. Nach abermaligem trocknen wird die Platte für 6o Minuten in 2%iger Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wird danach in Entfärberlösung (45 Vol% H_2O, 45 Vol% Alkohol, 1o Vol% Essigsäure) entfernt.
Als Referenz für den Eiweißnachweis dient 1:4 verdünntes Standardnormalplasma.

3.4. Metachromasie des Heparins mit Toluidin-Blau

Prinzip:

Toluidin-Blau ist seit langem als spezifischer Farbstoff für Heparin bekannt (49). Es bildet mit Heparin einen metachromatischen Farbkomplex. Dieser Komplex soll bei 485 nm sein Absorptionsmaximum haben.

Methode:

Zu o,5 ml Liquemin^{R} werden o,5 ml einer 1:1o verdünnten Toluidin-Blau-Lösung gegeben. Die Toluidin-Blau-Lösung wird, wie in Kap. 3.1. beschrieben, hergestellt. Die Extinktion der Lösung wird im Spectralphotometer (Hersteller: Beckmann Instruments Inc., Fullerton, USA) kontinuierlich im Wellenlängenbereich von 4oo nm - 75o nm gemessen.
Als Referenz diente 1 ml einer 1:2o verdünnten Toluidin-Blau-Lösung.

3.5. Quantitative Heparinbestimmung mit "stains-all"

Prinzip:

"Stains-all" ist ein Farbstoff, der zur Färbung von RNS und Mucopolysacchariden verwendet wird (2o). Da sich Heparin chemisch von den Polysacchariden ableitet, liegt es nahe, "stains-all" für eine quantitative Heparinbestimmung zu verwenden.

Methode:

Mit Liquemin^{R} wird in physiologischer Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe bis zum Faktor 1:2o48 hergestellt. "Stains-all" wird in 5o%iger wässeriger Formamidlösung zu einer Konzentration von o,oo5% gelöst. Zur Erstellung einer Spectralkurve werden zunächst o,5 ml Liquemin^{R} mit o,5 ml der 1:1o verdünnten "stains-all"-Lösung vermischt. Die Extinktion der Lösung wird im Beckmann-Spectralphotometer kontinuierlich im Wellenlängenbereich von 4oo nm - 7oo nm gemessen. Als Referenz diente 1 ml einer 1:2o verdünnten "stains-all"-Lösung.
Zur Erstellung einer Heparin-Eichgeraden werden o,5 ml jeder Liquemin^{R}-Verdünnung mit o,5 ml einer 1:1o verdünnten "stains-all"-Lösung gemischt.

Die Extinktion des Gemisches wird in Kunststoffküvetten bei 645 nm im Spectralphotometer gemessen. Die gemessenen Extinktionen werden gegen die entsprechenden Heparinkonzentrationen aufgetragen.

3.6. Elementaranalyse der Heparinpräparate zur i.v.-Applikation

Die lyophilisierte Heparinprobe wird im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Für die Bestimmung des C-, H-, N- und S-Gehaltes wird unter Zusatz von Vonadiumpentoxid (V_2O_5), bei allen O_2-Bestimmungen unter Zusatz von Indulin verascht.
Diese Analysen wurden im Mikroanalytischen Labor Dr. Pascha, Bonn, durchgeführt.

3.7. Na^+-, K^+- und Ca^{++}-Bestimmung der Heparinpräparate

Die Bestimmung erfolgte flammenphotometrisch (Flammenphotometer, Hersteller: Eppendorf Gerätebau, Hamburg). Entsprechend ihrer Na^+-, K^+- oder Ca^{++}-Konzentration mußten die untersuchten Heparine zur quantitativen Bestimmung der Elektrolyte in destilliertem Wasser vorverdünnt werden.

3.8. Auftrennung der Heparine mittels Isotachophorese

Prinzip

Die Isotachophorese ist ein elektrophoretisches Trennverfahren, das sich auf die Kohlrausch'sche Funktion stützt (27). Es eignet sich besonders zur Auftrennung von ionischen Stoffklassen. Zur Auftrennung der Proben benötigt man ein Leition mit hoher und ein Endion mit niedriger Motilität. Fließt nun ein Strom durch das Elektrolytsystem, so wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen vom Produkt aus Mobilität und Feldstärke bestimmt. Zwischen dem Leit- und dem Endion befindet sich die zu trennende Probe. Besteht die Probe aus Ionen unterschiedlicher Mobilität, so werden diese bei Anlegung eines Stromes unterschiedlich schnell wandern. Die Probe wird dadurch getrennt. Durch Zugabe von Spacerionen, das sind Ionen mit keiner oder nur geringer UV-Absorption, deren Mobilitäten zwischen denen der Probe liegen, kann die Auftrennung noch empfindlicher gemacht werden (26).

Methodik:

Die isotachophoretische Auftrennung der Heparine wurde mit einem 2127 Tachophor (Hersteller: LKB Producta, Bromma, Schweden) durchgeführt. Die Trennung der Proben findet in einer Teflonkapillare mit einer lichten Weite von o,5 mm statt. 2 µl bzw. 1 µl einer in physiologischer Kochsalzlösung 1:1o verdünnten Heparinprobe werden mittels Hamilton-Pipette in das Kapillarsystem injiziert. Zusätzlich wird noch 1 µl eines Spacerions (Ampholine^{R}, pH 4-6) dem System zugegeben. Für die Trennung der Proben wurden folgende Leit- bzw. Endionen verwendet:

Leition: 5 mM HCl + ß-Alanin auf pH = 3,55 eingestellt + o,3% HPNIC

Endion: 5 mM Capronsäure

Dann wurde eine Spannung von 13 kV bei einer Stromstärke von 8o µA angelegt. Die Analysezeit betrug 1o Minuten. Die aufgetrennten Proben wurden mit einem doppelten Detektorsystem nachgewiesen, bestehend aus:

- einem UV-Detektor Uvicord II (LKB Producter, Bromma, Schweden) zum direkten Nachweis von Bestandteilen mit UV-Absorption bei 34o nm,

- einem Thermodetektor (Hersteller: LKB Produkter, Bromma, Schweden) zur Registrierung des Thermosignals.

9. Gerinnungsphysiologische Untersuchungen zur quantitativen Heparinbestimmung

9.1. Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

Prinzip:
Die PTT entspricht der Rekalzifizierungszeit von Plasma in Gegenwart von Plättchenfaktor III und Oberflächenaktivator. Sie macht Aussagen über das endogene Gerinnungssystem und ist daher abhängig von der Aktivität der Faktoren I, II, V, VIII, IX, X, XI und XII. Die PTT ist eine besonders empfindliche Methode zur Bestimmung der Heparin-AT-III-Aktivität.

Methode:
Aus dem Standardheparin Roche wird in physiologischer Kochsalzlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Da die Heparinverdünnungen nicht stabil sind, müssen sie kurz vor Gebrauch hergestellt werden.

Standardnormalplasma wird in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die Lösung ist bei +4°C 1 Woche haltbar. Reines humanes AT III wird in destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 1 U/ml gelöst. Die Kaolin-Suspension (5 mg/ml) wird in Kochsalzlösung (5 mg NaCl/ml) hergestellt. Durch Überschütten der homogenen Kaolin-Lösung in das Fläschchen mit der PTT-Reagenz wird das Lyophilisat gelöst. Testansatz:

o,1 ml Standardnormalplasma
o,o5 ml AT-III-Lösung
o,o5 ml Heparinverdünnung
o,1 ml PTT-Reagenz

Die Mischung wird in Kunststoffröhrchen bei 37°C 2 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von o,1 ml einer o,o25 M $CaCl_2$-Lösung wird die Gerinnungszeit im Schnittger-Groß-Coagulometer bestimmt. Zur Erstellung einer Eichgeraden werden die gemessenen Gerinnungszeiten gegen die entsprechenden Heparinkonzentrationen aufgetragen.

3.9.2. Plasma-Thrombingerinnungszeit (modifiziert nach TROBISCH)

Prinzip:

Plasma wird mit Thrombinlösung bekannter Aktivität zur Gerinnung gebracht. Die Zeit von der Zugabe des Thrombins bis zur Gerinnung wird gestoppt. Sie hängt, außer von der Fibrinogenkonzentration, nur von der AT-III- und der Heparinkonzentration ab. Da bei dieser Methode eine Fibrinogenlösung bekannter Konzentration verwendet wird, hängt die Thrombinzeit nur von den letztgenannten Inhibitoren ab.

Methode:

a) 46 I.E. Thrombin werden in 1 ml o,o25 M $CaCl_2$-Lösung aufgelöst. Diese Stammlösung wird in Kunststoffröhrchen bei -8o°C gelagert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wird die Stammlösung in o,o5 mol/l $CaCl_2$-Lösung weiterverdünnt. Die Gebrauchslösung ist 1o Minuten stabil.
1 g Fibrinogen wird in 1oo ml destilliertem Wasser gelöst. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wird die Stammlösung in Barbitalpuffer pH = 5,75 1:2 weiterverdünnt. Die Lösung ist 2 bis 3 Stunden stabil. 1o U reines humanes AT III werden in 1o ml der Fibrinogen-

gebrauchslösung gelöst. Aus dem Standardheparin Roche wird in o,o5 molarer $CaCl_2$-Lösung eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Testansatz:

- o,1 ml Heparinverdünnung 37°C
- o,1 ml Fibrinogen-AT-III 37°C
- o,1 ml Thrombinlösung 37°C

Die Zeit von der Thrombinzugabe bis zur Gerinnselbildung wird im Schnittger-Groß-Coagulometer bestimmt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wird die Gerinnungszeit gegen die entsprechende Heparinkonzentration aufgetragen.

b) Als 2. Methode wurde eine optische Bestimmung des Gerinnungsendpunktes gewählt. Die Thrombin-, Heparin- und Fibrinogenlösungen werden, wie im Teil a) beschrieben, hergestellt. Kaolin wird in o,o25 molarer $CaCl_2$-Lösung zu einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst. In ein Kunststoffröhrchen, das bei 37°C inkubiert wird, werden die Substanzen wie folgt pipettiert:

- o,1 ml Heparinverdünnung
- o,1 ml Fibrinogen-AT-III
- o,1 ml Kaolin
- o,1 ml Thrombin

Nach Zugabe von Kaolin wird das Gemisch sorgfältig geschüttelt. Nach Zugabe des Thrombins wird die Zeit gemessen, die bis zur Gerinnselbildung vergeht. Zur Erstellung der Eichgeraden wird ebenfalls die Gerinnungszeit gegen die entsprechende Heparinkonzentration aufgetragen.

3.1o. Gerinnungsphysiologische Untersuchungen mit dem chromogenen Substrat S2222

3.1o.1. Allgemeines Prinzip

S2222 ist ein Tetrapeptid folgender Sequenz: BZ-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA. Dieses Peptid imitiert das natürliche Substrat des FXa(5o,51).Der Faktor Xa spaltet am Peptid die pNA-Gruppe proteolytisch ab. Freies pNA kann aufgrund seiner gelben Farbe im Spektralphotometer bei 4o5 nm gemessen werden. Die Menge des freigesetzten pNA/Zeit ist direkt proportional der Aktivität der Protease.

3.1o.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante der Wechselwirkung zwischen FXa und S2222

Prinzip:

Die Michaelis-Menten-Konstante ist die Basisgröße jeder enzymatisch gesteuerten Reaktion. Sie gibt Auskunft über die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat. Sie gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist (22,24). Die km wird nach Michaelis-Menten ermittelt, indem man eine konstante Enzymkonzentration mit steigender Substratkonzentration inkubiert und die gemessene Geschwindigkeit der Reaktion gegen die entsprechende Substratkonzentration aufträgt. Die Meßdaten ergeben eine Kurve, die sich der Endgeschwindigkeit (Vmax) asymptotisch nähert. Da sich die km mittels Originaldarstellung nur schwer ermitteln läßt, ist das am häufigsten verwendete Verfahren das nach LINEWEAVER und BURK (25). Dabei werden die Reziprokwerte der entsprechenden Substratkonzentrationen aufgetragen. Die Meßpunkte ergeben im Idealfall eine Gerade, die die Abszisse im negativen Teil schneidet.

Dieser Punkt entspricht $\frac{1}{km}$. Vor jeder Bestimmung der km ist es jedoch nötig, die Optima für Temperatur, pH und Puffersystem zu ermitteln.

Methodik:

Lyophilisiertes S2222 wird in destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 4 nmol/l gelöst. Die Lösung ist in dunklen Flaschen bei +4°C 1 Woche haltbar. Faktor Xa wird in o,25 molarem ß-Alanin-Puffer gelöst und in Portionen zu 1 ml in Kunststoffröhrchen bei -8o°C gelagert. Alle Lösungen werden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

Testansatz:

2oo µl o,25 molarer ß-Alanin-Puffer mit o,o25 m/l Ca-Lactat-Zusatz, 37°C

1oo µl FXa (unterschiedlicher Aktivität), 37°C

3oo µl S2222

Die Testansätze werden in vorgewärmten Plastik-Mikroküvetten hergestellt. Die Extinktion wird in einem Eppendorf-Spectralphotometer (Hersteller: Eppendorf, Hamburg) mit temperiertem Küvettenhalter bei 4o5 nm gemessen. Das Photometer ist über ein Digitalvoltmeter

(Hersteller: Vogel, Giessen) mit einem Linearschreiber (Hersteller: Vogel, Giessen) verbunden. Nach Zugabe des Substrats wird die Extinktionszunahme kontinuierlich über 5 Minuten mittels Linearschreiber aufgezeichnet. Der Extinktionsanstieg AE/min. wird zeichnerisch durch Bestimmung der Geradensteigung ermittelt. Die Bestimmung der km erfolgt zum einen nach Michaelis-Menten und zum anderen nach Lineweaver-Burk. Die Bestimmung nach Michaelis-Menten erfolgte unter Verwendung des Modells der kleinsten Fehlerquadrate. Dies soll im folgenden kurz dargestellt werden.

3.1o.3. Mathematisches Modell zur Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante (km)

Oblicherweise werden km und Vmax grafisch bestimmt oder durch Anpassung an die Gerade, die sich im Lineweaver-Burk-Plot durch die Transformation: $\frac{1}{v} = \frac{km}{Vmax} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{Vmax}$ ergibt. Durch die linearisierende Transformation wird die km, bedingt durch Verzerrungen oder Randwerte, in der Regel überschätzt. Eine exakte Schätzung kann erfolgen entweder durch Einführung

von Gewichtsfaktoren oder durch eine direkte Anpassung an die nicht lineare Gleichung $v = \frac{Vmax \cdot s}{km + s}$. Hierbei wird durch ein iteratives Gradientenverfahren die Summe der Abweichungsquadrate $Q = \sum_{i=1}^{n} (v_i - \frac{Vmax \cdot Si}{Si+km})$ minimiert.

Dieses Verfahren wurde zur Ermittlung der km gewählt. Zur Berechnung wurde das Programmpaket BMDP (= Biomedical Computer programs), Programm BMDP3R verwendet. Die Berechnungen wurden im Institut für Biomathematik und medizinische Statistik der Universität Düsseldorf durchgeführt.

3.1o.4. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (km) der Wechselwirkung zwischen FXa, ATIII und S2222

ATIII hemmt FXa in einer zeitabhängigen Reaktion. Die Bestimmung der km einer enzymatischen Reaktion in Gegenwart eines Inhibitors gibt Auskunft über den Typ der Inhibition. Das Meßprinzip beruht auf folgendem Reaktionsschema:

$$FXa(\text{Oberschuss}) + ATIII \xrightarrow{\text{tink}} FXa \cdot ATIII + FXa(\text{Rest})$$

$$S2222 \xrightarrow{FXa(\text{Rest})} \text{Peptid} + pNA$$

Methodik:

FXa und S2222 werden, wie in Kap. 3.1o.2. beschrieben, hergestellt. Humanes ATIII wird in destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 1 U/ml gelöst und in Portionen zu 1oo µl in Kunststoffröhrchen bei -8o°C gelagert. Das tiefgefrorene ATIII wird kurz vor Gebrauch aufgetaut und in 37°C warmem ß-Alanin-Puffer verdünnt. Die aufgetaute ATIII-Lösung ist nur begrenzt haltbar.

Testansatz:

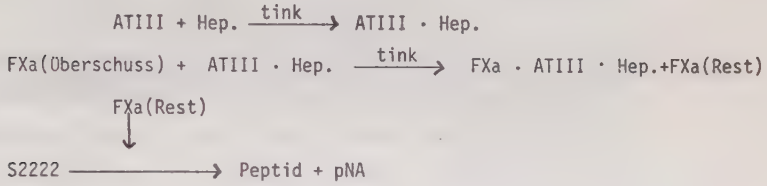
2oo µl ATIII-ß-Alanin-Puffer, 37°C
1oo µl FXa, 37°C
Inkubation 6o sec. bei 37°C
3oo µl Substrat, 37°C

Nach Zugabe des Substrats wird die Extinktion, wie in 3.1o.2. beschrieben, gemessen. Die Bestimmung der km erfolgte entsprechend Kap. 3.1o.2. bzw. 3.1o.3.
Es wurden mehrere Versuchtsreihen mit unterschiedlicher ATIII-Konzentration durchgeführt.

3.1o.5. Bestimmung der km der Wechselwirkung zwischen FXa, ATIII und S2222 in Anwesenheit von Heparin

Prinzip:

Die Bestimmung der km beruht auf folgendem Testprinzip:



Methodik:

FXa, ATIII und S2222 werden, wie in 3.1o.2. und 3.1o.3. beschrieben, hergestellt. Schweinemicosaheparin (spez. Aktivität 173 USP/mg) wird in o,25 molarem ß-Alanin-Puffer mit o,o25 mol/l Ca-Lactat-Zusatz zu einer Konzentration von 1oo U/ml gelöst und in silikonisierten Glasröhrchen bei -8o°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wird das Heparin aufgetaut und in 37°C warmen Puffer verdünnt.

Testansatz:

2oo µl ATIII-Puffer, 37°C

1o µl Heparin, 37°C

Inkubation 6o sec. bei 37°C

1oo µl FXa, 37°C

Inkubation 3o sec. bei 37°C

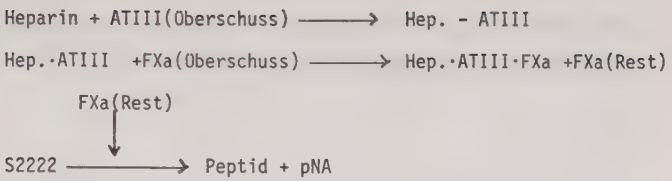
3oo µl Substrat, 37°C

Die Aufzeichnung der Extinktion und die Bestimmung der km erfolgte wie in 3.1o.2. und 3.1o.3. beschrieben. Es wurden mehrere Versuchsreihen mit unterschiedlicher Heparinkonzentration durchgeführt.

3.1o.6. Quantitative Heparinbestimmung mittels Coatest^{R}

Prinzip:

Die Heparinbestimmung erfolgt im Komplex mit ATIII. Um eine konstante und ausreichende Konzentration von ATIII zu erreichen, wird es in hochgereinigter Form dem Testplasma zugesetzt. Das Reaktionsschema sieht folgendermaßen aus:



Die unbekannte Heparinkonzentration einer Probe wird über eine Standardkurve ermittelt. Das Testsystem soll so ausgelegt sein, daß die Extinktionsabnahme im Bereich von o,1 - o,7 U Heparin/ml linear ist.

Methodik:

Für die Erstellung der Eichkurve wurde Heparin Roche verwendet. Es wurde in o,15 molarer NaCl-Lösung zu einer Konzentration von o,2 U/ml verdünnt. Was die Herstellung der Reagenzien und die Erstellung der Standards anbetrifft, so hielten wir uns genau an die vom Hersteller herausgegebene Laboranweisung (21). Auch der Testansatz entspricht der Laboranweisung (21). Die Extinktion wurde in Kunststoff-Mikroküvetten im Spectralphotometer (Eppendorf) bei 4o5 nm gemessen. Neben dem Standardheparin wurden auch Heparine zur i.v.-Applikation untersucht.

3.1o.7. Untersuchung verschiedener Heparinfraktionen mit dem chromogenen Substrat S2222

Vorbemerkung:

Es wurden 5 Fraktionen (Probe 1-5) untersucht, die durch Fraktionierung an Sephadex G 1oo aus dem üblichen Ausgangsprodukt zur Fertigung von Na-Heparin gewonnen wurden. Die Probe 0 entspricht dem Ausgangsprodukt. Die Fraktionierung erfolgte in Anlehnung an JOHNSON (52). Die Fraktionen wurden uns freundlicherweise von der Fa. Braun Melsungen AG zur Verfügung gestellt.

Methodik:

Die einzelnen Proben unterschiedlicher Aktivität (Tab.16) werden in ß-Alanin-Puffer zu einer Konzentration von 1o U/ml gelöst. ATIII wird, wie in 3.1o.3. beschrieben, hergestellt. 71 nkat FXa werden in 7,2 ml destilliertem Wasser gelöst. 25 mg S2222 werden in destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 4 mmol/l gelöst.

Testansatz:

200 µl ATIII-Puffer (ATIII Konz.=0,025 U/ml), 37°C
10 µl bzw. 7,5 µl, 5,0 µl, 2,5 µl, 1,0 µl Heparin, 37°C
Inkubation 60 sec. bei 37°C
100 µl FXa
Inkubation 30 sec. bei 37°C
300 µl Substrat

Die Extinktionszunahme pro Minute (E/min.) wurde, wie in 3.1o.2. beschrieben, ermittelt.

3.1o.8. Untersuchung verschiedener Heparine zur i.v.-Applikation mit dem Substrat S2222

Vorbemerkung:
Aufbauend auf den Erkenntnissen aus den vorherigen Untersuchungen (Kap. 3.1o.2. - 3.1o.6.) sollen nun Heparine mit einem, in Anlehnung an den Coatest^{R}, modifizierten Test untersucht werden.

Methodik:
ATIII, FXa und S2222 werden, wie in 3.1o.7. beschrieben, hergestellt.

Alle Heparine werden in ß-Alanin-Puffer zu einer Konzentration von 1o U/ml verdünnt.

Testansatz:

2oo µl ATIII-Puffer (o,o25 U/ml ATIII), 37°C

1o µl bzw. 7,5 µl, 5,o µl, 2,5 µl, 1,o µl Heparin, 37°C

Inkubation 6o sec. bei 37°C

1oo µl FXa, 37°C

Inkubation 3o sec. bei 37°C

3oo µl Substrat

Die Messung der Extinktionszunahme E/min. erfolgte entsprechend der in Kap. 3.1o.2.

4. ERGEBNISSE

4.1. Physikochemische Untersuchungen der Heparine

4.1.1. Ergebnisse der Agarose-Suchelektrophorese

In der Agarose-Suchelektrophorese stellten sich fast alle untersuchten Heparine einbandig dar (Tab.1). Nur 2 Präparate, Liquemin^{R} und Calciparin^{R} zeigten 2 Banden (Abb.4). Bei beiden Heparinen liegen 2 Banden eng beieinander. Versuche,durch Sprengung hydrophober und/oder Wasserstoffbindungen das Trennvermögen der Elektrophorese zu erhöhen, schlugen fehl: auch in Gegenwart von Harnstoff konnte die Auftrennung nicht erhöht werden. Tab.1 zeigt ebenfalls, daß sich die kommerziellen Heparine in der Elektrophorese sehr unterschiedlich darstellen. Selbst die Heparine 1 - 7, bei denen es sich um unterschiedliche Chargen des gleichen Heparins handelt, zeigen unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten. Die größte Mobilität zeigt das Heparin Nr. 21, die geringste das Heparin Nr. 1. Mit dem anschließend durchgeführten Eiweißnachweis durch Coomassie-Brilliant-Blue^{R} konnte gezeigt werden, daß alle untersuchten Präparate proteinfrei sind.

4.1.2. Ergebnisse der Flammenphotometrie

Die in Tab. 2 dargestellten Ergebnisse erlauben eine Unterteilung der Heparine in 3 Gruppen:

- in Na-reiche Heparine (Nr. 23,18)
- in Kalium-reiche Heparine (Nr.23)
- in Kalzium-reiche Heparine (Nr. 9,1o,16,17)

Die Heparine 9 und 1o zeigen weiterhin eine extreme Na-Armut. Das Heparin Nr. 23 stellt insoweit eine Ausnahme dar, als es neben dem höchsten Na-Gehalt auch den höchsten Kaliumgehalt aufweist. Die Heparine 1 - 6 sind verschiedene Chargen des gleichen Heparins.
Wie aus Tab.2 ersichtlich, schwanken die Bestimmungen von Charge zu Charge teilweise erheblich.

4.1.3. Ergebnisse der Elementaranalyse

Bei einigen der untersuchten Heparine wurde eine Elementaranalyse durchgeführt (Tab.3). Die Analyse in Gewichtsprozent ergibt für alle Heparine unterschiedliche Ergebnisse. Auffallend ist das Heparin Nr. 5, das bei allen Bestimmungen die niedrigsten Werte aufweist.
Was die atomaren Relationen anbetrifft, so ist vor allem ein sehr konstantes SIC-Verhältnis hervorzuheben.

4.1.4. Ergebnisse der Isotachophorese

In den Abbildungen 5 und 6 ist der Verlauf der Trennung dargestellt. Die Heparine 1 --4, verschiedene Chargen des gleichen Heparins, zeigen zum einen ein zweigipfeliges Maximum (Heparine 3 u. 4) und zum anderen ein eingipfeliges Maximum (Heparine 1 u. 2). Die Maxima der Heparine 5 - 9 sind ebenfalls eingipfelig. Die Auftrennungen der Heparine 11 und 12 zeigen einen ähnlichen Verlauf. Beide Maxima sind doppelgipfelig, wobei der erste Gipfel kleiner als der zweite ist.
Wie aus den Abb. 5 u. 6 hervorgeht, variieren die Maxima der untersuchten Heparine in ihrer Höhe. Im Gegensatz zu den Heparinen 1 - 4 weisen die Heparine 5 - 11 ein weiteres Maximum am Ende der Auftrennung auf.

Feldstärke der Platten: 5,5 V/cm.
Die Werte für die Wanderungsstrecke sind Mittelwerte (aus 3 Messungen).

	HEPARIN	Wanderungs-strecke cm	elektrische Mobilität $\frac{\text{Wanderungsstrecke}}{\text{Feldstärke}}$	Anzahl d. Banden
1	B74B Medac	4,53	3,o2	1
2	A62A Medac	4,56	3,o4	1
3	V72A Medac	4,76	3,17	1
4	U72A Medac	4,76	3,17	1
5	A66A Medac	4,7o	3,13	1
6	A71A Medac	4,72	3,15	1
7	A63A Medac	4,63	3,o9	1
8	X72B Medac	4,67	3,11	1
9	X72C Medac	4,67	3,11	1
1o	X72C Medac	4,67	3,11	1
11	Riker 3ooo	4,78	3,19	1
12	Riker 5ooo	4,93	3,29	1
13	Riker (Spritze)	4,82	3,21	1
14	Sandoz	4,85	3,23	1
15	Liq 67oS74P	4,67	3,11	2
16	Liq 728X93E	4,67	3,11	2
17	Liq 251072T	4,78	3,19	2
18	Braun Melsungen	4,77	3,18	1
19	Sodium (Pulver)	4,78	3,19	1
2o	Nordmark	5,25	3,5o	1
21	Thrombophob	5,27	3,51	1
22	SP54	--	--	(1)
23	Thromboliquine	5,25	3,5o	1
24	Calciparin	5,12	3,41	2

Tab.1: Ergebnisse der Agarose-Suchelektrophorese I

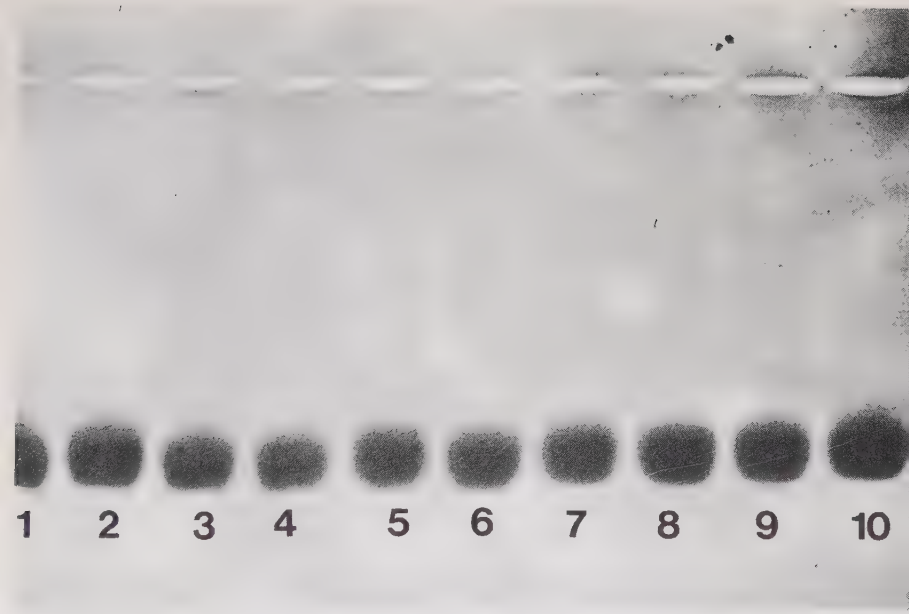


Abb.4/I:
Agarose-Suchelektrophorese
(Die Nummerierung entspricht der in Tab.1)

	HEPARIN	Na [mv/l]	K^+ [mv/l]	Ca^+ [mg/l]
1	Medac B74B	149	7,o5	o,4o
2	Medac 73A	156	7,1o	o,3o
3	Medac B6NA	158	7,85	o,35
4	Medac A75A	166	6,6o	o,2o
5	Medac A71A	152	7,o5	o,35
6	Medac B72A	166	7,15	o,35
7	Medac U72A	153	5,75	o,78
8	Medac V72A	158	5,78	o,52
9	Medac X72A	6	1,16	154,oo
1o	Medac X72B	4	1,o8	158,oo
11	Riker 5ooo	24o	1,5o	o,9o
12	Riker 1oooo	2o5	3,25	o,85
13	Riker 2oooo	215	2,6o	1,o7
14	Riker 25ooo	27o	3,3o	o,75
15	Riker 4oooo	176	5,91	1,o5
16	Calciparin	34	2,8o	1o6,oo
17	Braun Melsungen	5o	1,25	1o7,oo
18	Sandoz	3o5	1,o5	1,oo
19	Thromboliquine	31o	7,oo	1,2o
2o	Liquemin	28o	1,oo	1,65
21	Thrombophob	21o	7,oo	o,5o
22	Nordmark	178	6,7o	1,o6
23	Organon	32o	14,oo	1,55

(Alle Angaben beziehen sich auf eine Heparinkonzentration von 5ooo U/ml)

Tab.2: Ergebnisse der Flammenphotometrie

Heparin Code-Nr.	Anteil der Elemente in Gewichts-Prozent					Anteil der Elemente in Atom-Prozent					Atomare Relationen				
	C	H	N	O	S	C	H	N	O	S	H/C	N/C	O/C	S/C	S/N
1	22,92	3,o5	2,1o	46,68	11,87	22,8	36,2	1,78	34,8	4,42	1,6	o,o8	1,5	o,19	2,5
2	23,55	3,o3	2,16	47,38	11,51	23,3	35,6	1,78	35,1	4,27	1,5	o,o8	1,5	o,18	2,4
3	22,86	3,o2	1,95	43,14	1o,3o	23,7	37,1	1,73	33,4	3,9o	1,6	o,o7	1,4	o,17	2,3
4	23,1o	3,o9	2,11	46,8o	11,7o	23,o	36,2	1,77	34,6	4,4o	1,6	o,o8	1,5	o,19	2,5
5	19,62	2,58	1,77	37,62	9,27	23,5	36,7	1,86	33,7	4,2o	1,6	o,o8	1,4	o,18	2,2
6	21,82	2,87	2,o1	43,68	1o,63	23,o	36,3	1,78	34,7	4,2o	1,6	o,o8	1,5	o,18	2,4

Tab.3: Ergebnisse der Elementaranalyse

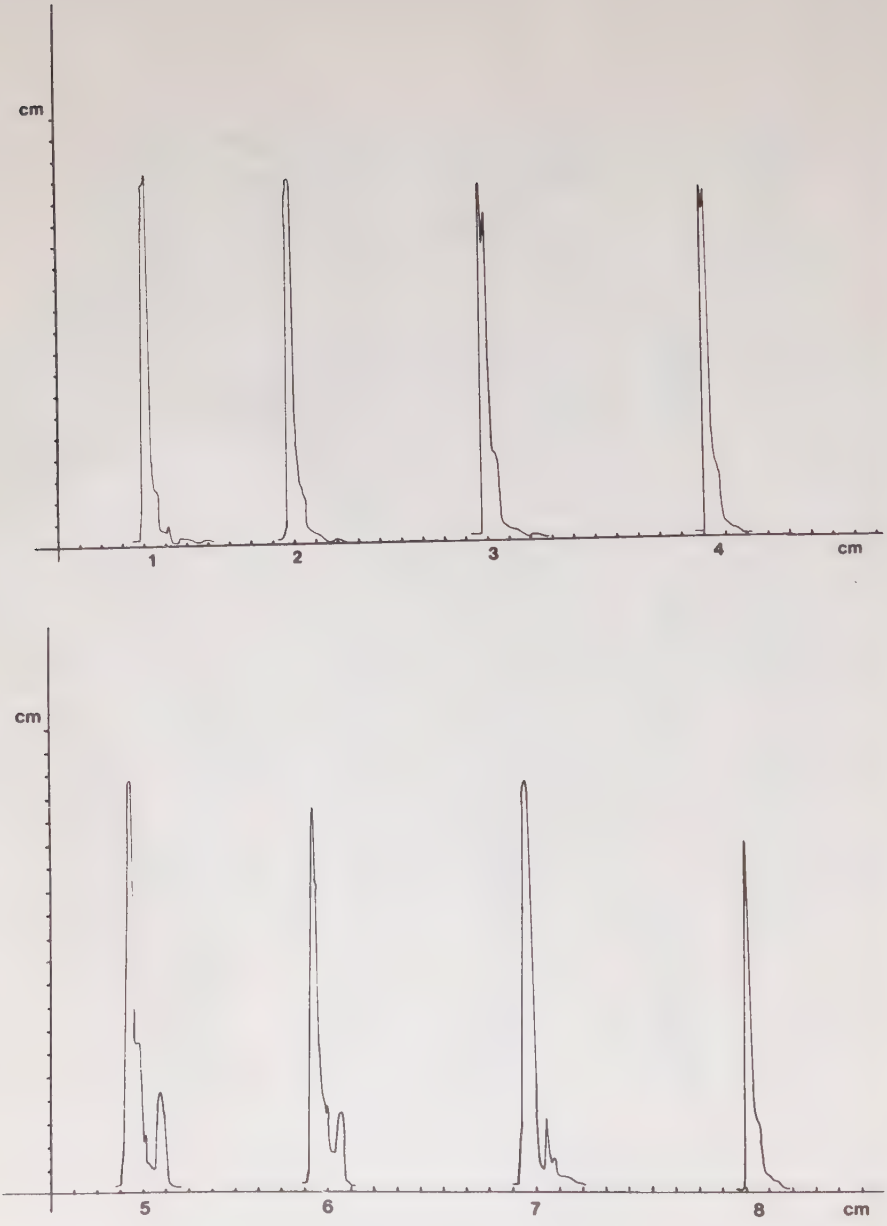


Abb.5: Isotachophorese
(Zuordnung der Zahlen siehe S.53)

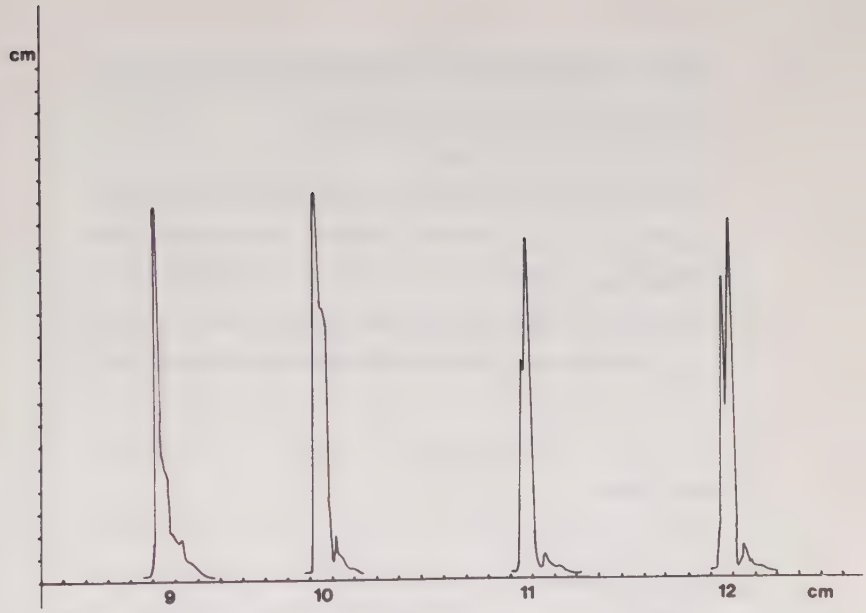


Abb.6: Isotachophorese

1 = Heparin Medac^{R}: Charge A 63 A
2 = Heparin Medac^{R}: Charge A 66 A
3 = Heparin Medac^{R}: Charge A 71 A
4 = Heparin Medac^{R}: Charge B 74 B
5 = Organon^{R}-Heparin
6 = Thromboliquine^{R}
7 = Thrombophob^{R}
8 = Heparin Dihydergot^{R}
9 = Riker^{R}
1o = Heparin Braun-Melsungen
11 = Calciparin^{R}
12 = Liquemin^{R}

4.2. Metachromasie-Versuch einer quantitativen Heparinbestimmung mittels "stains-all"

Heparin bildet mit Tolnidin-Blau einen metachromatischen Farbkomplex (Abb.7). Die Spectralkurve des reinen Farbstoffs zeigt ein Maximum bei 395 nm, die Spectralkurve des metachromatischen Farbkomplexes hat zwei Maxima: das eine bei 5oo nm, das andere bei 6oo nm. Wie Abb.7 zeigt, wird das erste Maximum bei 5oo nm von der Spectralkurve des reinen Farbstoffs überlagert.

Auch mit dem Farbstoff "stains-all" bildet Heparin einen Farbkomplex. Spectralphotometrische Untersuchungen des reinen Farbstoffes (Abb.8) zeigen 2 Maxima: bei 53o nm und bei 57o nm Wellenlänge. Der Farbkompex hat ebenfalls 2 Maxima: eines bei 485 nm und eines bei 645 nm Wellenlänge. Das erste Maximum wird durch die Kurve des reinen Farbstoffs überlagert.

Tab.4 zeigt die Ergebnisse einer quantitativen Heparinbestimmung. Wie aus Abb.9 zu entnehmen ist, besteht im Konzentrationsbereich von 8o - 64o U/ml eine gute Korrelation zwischen Extinktion und Heparinkonzentration,

bei allerdings geringer Empfindlichkeit. In einem weiteren Konzentrationsbereich (0 - 5 U/ml) findet sich ebenfalls eine gute Korrelation mit wesentlich besserer Empfindlichkeit als im ersten Fall.
Die Standardabweichungen in Tab.4 zeigen, daß, besonders im oberen Konzentrationsbereich, die Streuung der Messung groß ist. Die Streuung wird zum unteren Konzentrationsbereich hin geringer.

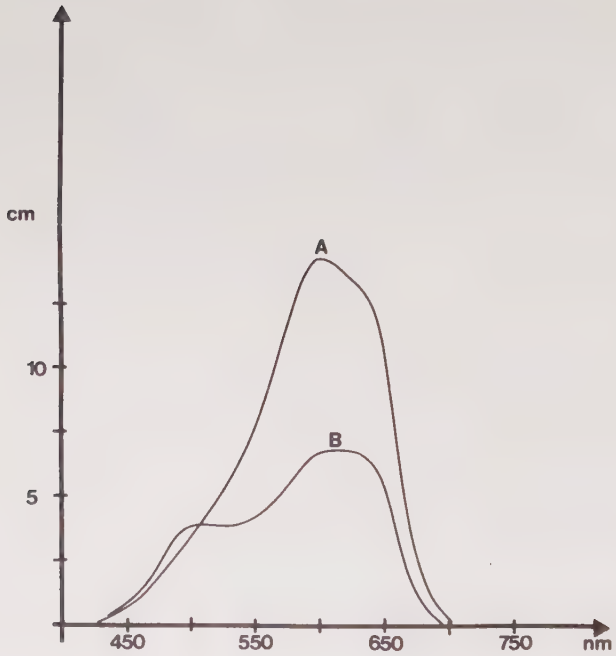


Abb.7:
Spectralkurve Heparin - Toluidin-Blau

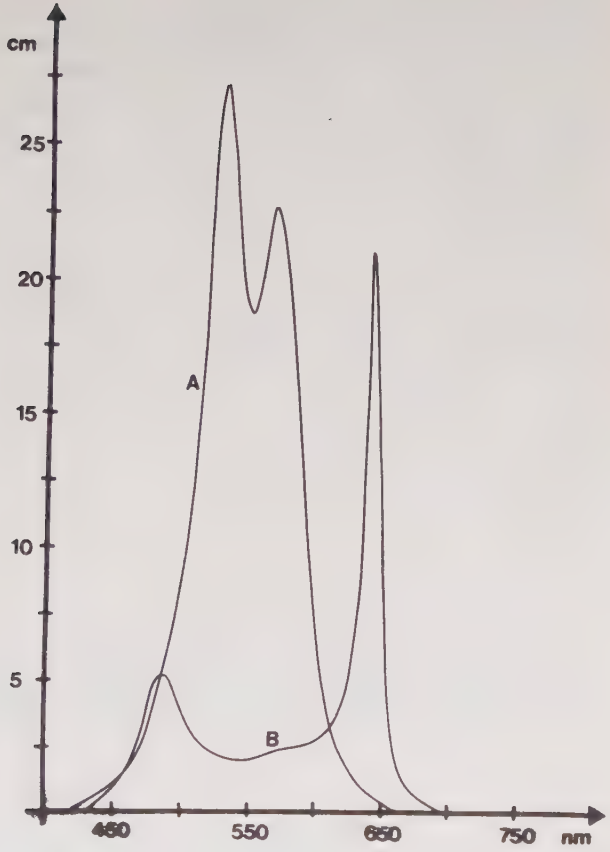


Abb.8:
Spectralkurve Heparin - "stains-all"

Lfd.Nr.	U/ml Hep.	Extinktion 1.Messung	Extinktion 2.Messung	$\bar{x}$	$\pm s$
1	125o,oo	1,433	1,262	1,348	o,12
2	625,oo	1,728	1,562	1,645	o,18
3	312,5o	1,536	1,375	1,455	o,11
4	156,25	1,4o6	1,19o	1,298	o,15
5	78,125	1,364	1,222	1,293	o,1o
6	39,o6	1,257	1,117	1,187	o,1o
7	19,53	1,222	1,113	1,168	o,o8
8	9,76	1,o82	o,922	1,oo2	o,11
9	4,88	o,995	o,885	o,94o	o,o8
1o	2,44	o,866	o,771	o,819	o,o7
11	1,22	o,583	o,529	o,556	o,o4

Gemessen wurde im Beckman-Photometer bei 645 nm gegen Luft.

Tab.4: Ergebnisse "stains-all"

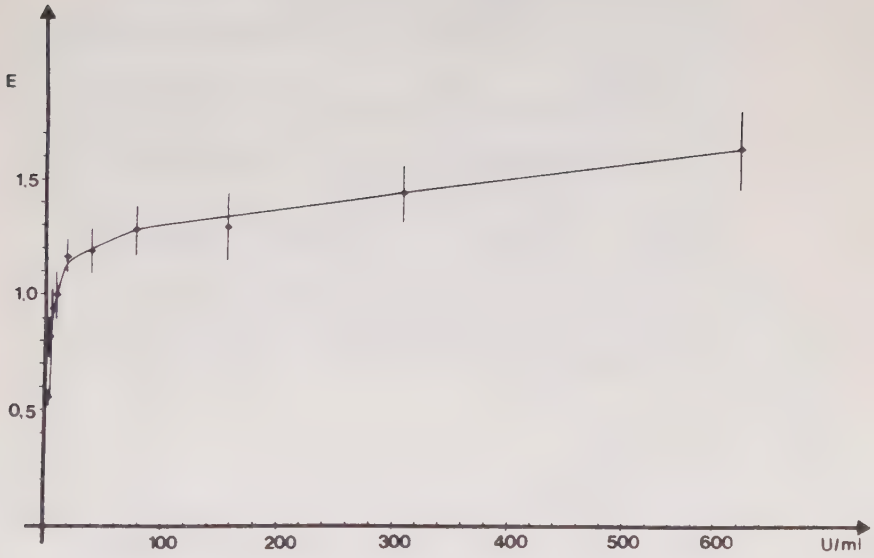


Abb.9:
Quantitative Heparinbestimmung mittels "stains-all"

4.3. Ergebnisse der "klassischen" gerinnungsphysiologischen Untersuchungen

4.3.1. Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

Tab.5 zeigt die Ergebnisse. Es wurden jeweils 4-fach-Bestimmungen durchgeführt. Die graphische Darstellung (Abb.1o) zeigt eine gute Korrelation von Gerinnungszeit und Heparinkonzentration in einem Konzentrationsbereich von o,35 - 1,4 U Heparin/ml. Wie jedoch aus Tab.5 zu entnehmen ist, ist gerade im hohen Konzentrationsbereich die Streuung der Methode sehr groß; im unteren Konzentrationsbereich sind die Werte dagegen gut reproduzierbar.

4.3.2. Thrombinzeit

a) Bestimmung des Gerinnungszeitpunktes im Coagulometer

Es wurden 3 Versuchsserien mit unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen durchgeführt (Tab.6).
Wie Abb.11 zeigt, besteht bei allen Thrombinkonzentrationen eine gute Korrelation zwischen Gerinnungszeit und Heparinkonzentration, und zwar für einen Konzentrationsbereich o,2 - 1,5 U/ml Heparin.

Allerdings ist die Streuung der Methode, vor allem im hohen Konzentrationsbereich, groß (Tab.6), wobei die Streuung bei der kleinsten Thrombinkonzentration etwas geringer ist.

b) Bestimmung des Gerinnungszeitpunktes nach Sicht

Tab.7 zeigt die Ergebnisse. Die graphische Darstellung (Abb.12) zeigt eine gute Korrelation zwischen Gerinnungszeit und Heparinkonzentration für den Konzentrationsbereich von 0 - 1,o U Heparin/ml. Wie aus Tab.7 ersichtlich, nimmt die Standardabweichung mit abnehmender Heparinkonzentration ebenfalls ab.

Heparin U/ml	Gerinnungszeit (t) [sec.] 1.	2.	3.	4.	$\bar{x}$	$\pm s$
1,38o	7o3,2	636,6	565,2	581,2	621,55o	62,44
o,69o	278,6	286,4	273,7	296,8	283,8oo	1o,o8
o,345	125,4	123,o	159,4	117,7	131,7oo	18,96
o,172	69,3	72,2	67,8	66,9	69,o5o	2,32
o,o86	49,8	5o,1	5o,5	5o,3	5o,175	o,66
o,o43	44,4	42,4	41,4	42,o	42,6oo	1,29
o,o22	42,4	42,o	41,6	4o,5	41,63o	o,82

Tab.5: Ergebnisse: Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

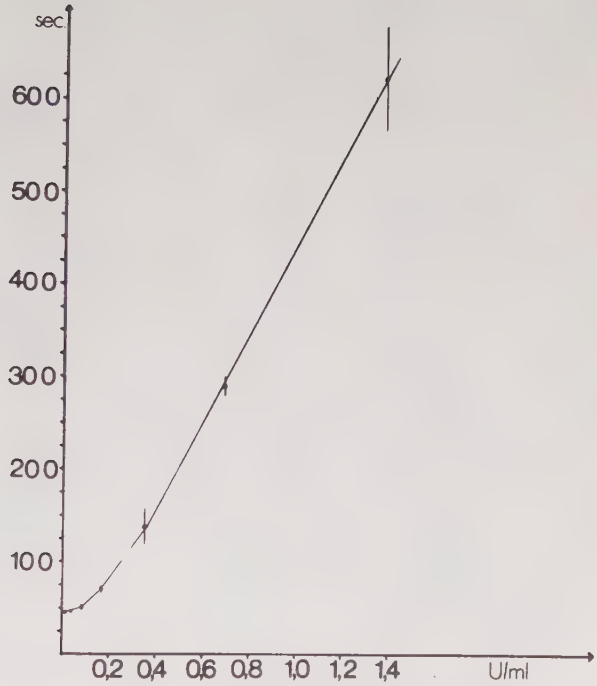


Abb.1o:
Partielle Thromboplastinzeit (PTT)

Hep.Konz. U/ml	Gerinnungszeit sec. 1	2	3	4	$\bar{x}$	$\pm s$	
1,5	12o,o	1o3,7	12o,o	99,5	11o,8	1o,76	Thrombin-Stammlösung 1:5 verdünnt = E/ml 9,2
1,o	84,3	9o,3	86,6	84,7	86,5	2,74	
o,8	74,2	78,7	73,7	69,8	74,1	3,64	
o,6	65,9	42,5	48,2	--	52,1	12,2o	
o,4	38,7	4o,3	44,5	--	41,2	3,oo	
o,2	17,5	17,5	14,9	--	16,2	1,59	
1,5	36,8	27,5	29,9	--	31,4	4,83	Thrombin-Stammlösung 1:2,5 verdünnt = E/ml 18,4
1,o	28,2	25,9	27,3	3o,8	28,1	2,o6	
o,8	25,5	21,4	26,4	27,4	25,2	2,63	
o,6	17,4	17,2	17,2	--	17,3	o,12	
o,4	11,4	1o,9	11,5	12,7	11,6	o,76	
o,2	5,2	7,o	6,4	7,3	6,5	o,93	
1,5	76,3	63,3	72,7	54,1	63,6	1o,56	Thrombin-Stammlösung 1:3,33 verdünnt = E/ml 13,81
1,o	55,2	37,5	46,7	5o,6	46,5	7,61	
o,8	24,4	27,4	47,6	32,2	32,3	1o,34	
o,6	23,4	31,o	28,5	29,5	27,2	3,46	
o,4	18,9	2o,7	2o,2	19,o	19,7	o,89	
o,2	1o,o	8,4	7,6	9,1	8,8	1,o2	

Tab.6: Modifizierte Thrombinzeit-Bestimmung des Gerinnungszeitpunktes im Coagulometer

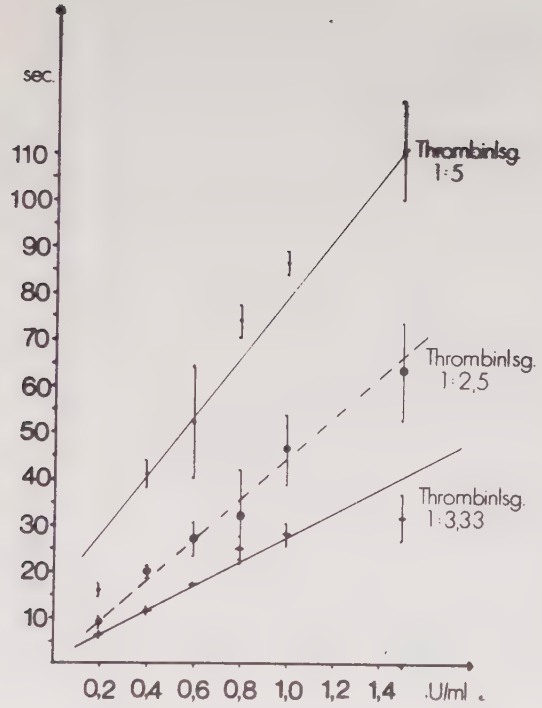


Abb.11:
Modifizierte Thrombinzeit-Bestimmung im Koagulometer

Hep.Konz. U/ml	Gerinnungszeit sec. 1.	2.	3.	4.	$\bar{x}$	$\pm s$
1,o	85,9	84,5	88,9	89,1	87,1	2,3o
o,8	75,7	7o,6	71,1	76,7	73,5	3,12
o,6	52,o	54,o	54,4	54,3	53,2	1,36
o,4	33,6	31,9	33,4	3o,3	32,3	1,53
o,2	15,3	18,3	16,5	18,4	17,1	1,5o
o,o	9,9	11,o	11,8	1o,1	1o,7	o,88

Tab.7: Modifizierte Thrombinzeit - optische Bestimmung des Gerinnungszeitpunktes

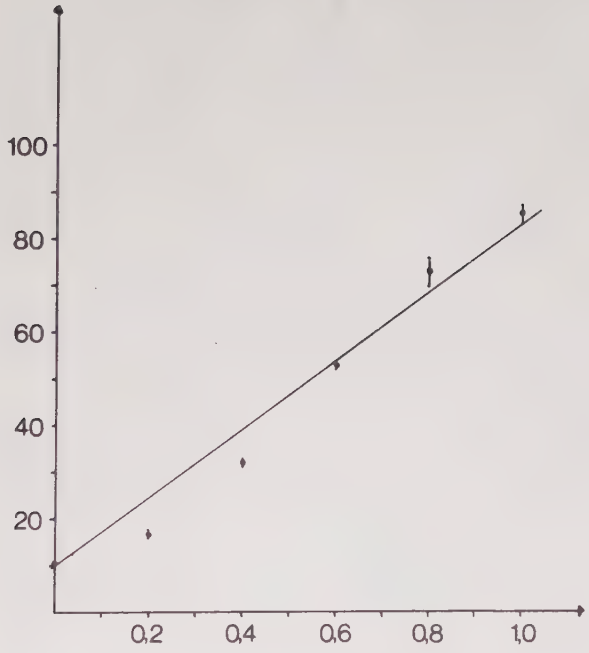


Abb.12:
Modifizierte Thrombinzeit-Bestimmung nach Sicht

4.4. Voruntersuchungen zur Ermittlung der pH- und Pufferoptima für die kinetischen Untersuchungen

Zunächst wurde die Pufferkapazität des üblicherweise verwendeten 7,5 milimolaren Tris-Puffers überprüft (Tab.8). Zu diesem Zweck wurden, nach Inkubation von konstanten Mengen an FXa und unterschiedlichen Mengen an Substrat, pH-Messungen während der Hydrolyse durchgeführt. Wie Tab.8, Spalte 1, zeigt, reagiert die Substratlösung sehr sauer. Der pH schwankt, je nach Konzentration, zwischen 3,58 und 4,1o. Der pH-Verlauf während der Hydrolyse zeigt, daß der Tris-Puffer zu keiner Zeit in der Lage ist, den pH konstant zu halten. Der pH fällt während der Hydrolyse kontinuierlich ab. Parallel zur pH-Messung wurde die Extinktionszunahme kontinuierlich über 5 Minuten registriert. Wie Abb.13 zeigt, ist der Extinktionsanstieg über 5 Minuten unlinear.

Aus diesen Befunden ergab sich die Notwendigkeit, ein neues Puffersystem zu entwickeln. Bei der Untersuchung verschiedener Puffer stellte sich ein ß-Alanin-Puffer pH = 8,4 als der beste heraus.

Die pH-Messung während der Hydrolyse (Tab.9) zeigt eine relativ gute pH-Konstanz. Eine ebenfalls parallel dazu durchgeführte Registrierung der Extinktion über 5 Minuten zeigt einen linearen Umsatz (Abb.13). Zur Ermittlung der optimalen ß-Alanin-Konzentration wurde die Extinktionszunahme/min. (E/min.) bei Verwendung eines Puffers mit unterschiedlicher ß-Alanin-Konzentration ermittelt (Tab.1o). Die Ergebnisse zeigen einen abnehmenden Substratumsatz bei abnehmender ß-Alanin-Konzentration. Eine parallel dazu durchgeführte Registrierung der Extinktion über 5 Minuten (Abb.14) zeigt, daß mit abnehmender ß-Alanin-Konzentration die Umsätze linear werden. Trotz geringerem Substratumsatz, bei jedoch linearem Umsatz, wurde eine o,25 molare ß-Alanin-Konzentration als die geeignetste angesehen und für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Des weiteren wurde noch die Möglichkeit überprüft, dem Puffer zur Stabilisierung des Enzyms Kalzium hinzuzufügen (Tab.11). Hierzu wurden konstante Mengen an FXa und o,25 M/l ß-Alanin-Puffer mit unterschiedlicher Ca-Konzentration inkubiert. Nach Zugabe von Substrat wurde die Extinktionszunahme kontinuierlich registriert.

Wie Tab.11 zeigt, werden die Extinktionszunahmen pro Minute (E/min.) in Gegenwart von Calcium kleiner. Die geringsten Veränderungen sind bei einer Ca-Konzentration von o,o25 M/l zu beobachten.
Diese Menge wurde auch für alle weiteren Versuche dem Puffer zugesetzt.

Substrat-Konz. mmol/ml	pH der Substrat-Lösung	pH nach Hydrolysezeit min. 1'	2'	3'	4'	5'
2,o	3,58	8,17	8,1o	8,1o	8,13	8,o4
1,o	3,75	8,16	8,1o	8,1o	8,11	8,o5
o,5	3,88	8,13	8,1o	8,o9	8,o8	8,o6
o,2	4,1o	8,13	8,o9	8,o8	8,o8	8,o6

Ansatz: 2oo µl Tris-Puffer 7,5 mmol/l, pH = 8,4
o,9 nkat Xa
3oo µl Substrat

Tab.8: pH-Verlauf während der Hydrolyse bei Verwendung eines Tris-Puffers pH = 8,4

Substrat-Konz. mmol/ml	pH der Substrat-Lösung	pH nach Hydrolysezeit min. 1'	2'	3'	4'	5'
2,o	3,58	8,22	8,2o	8,2o	8,19	8,19

Tab.9: pH-Verlauf während der Hydrolyse bei Verwendung eines o,25 M ß-Alanin-Puffers

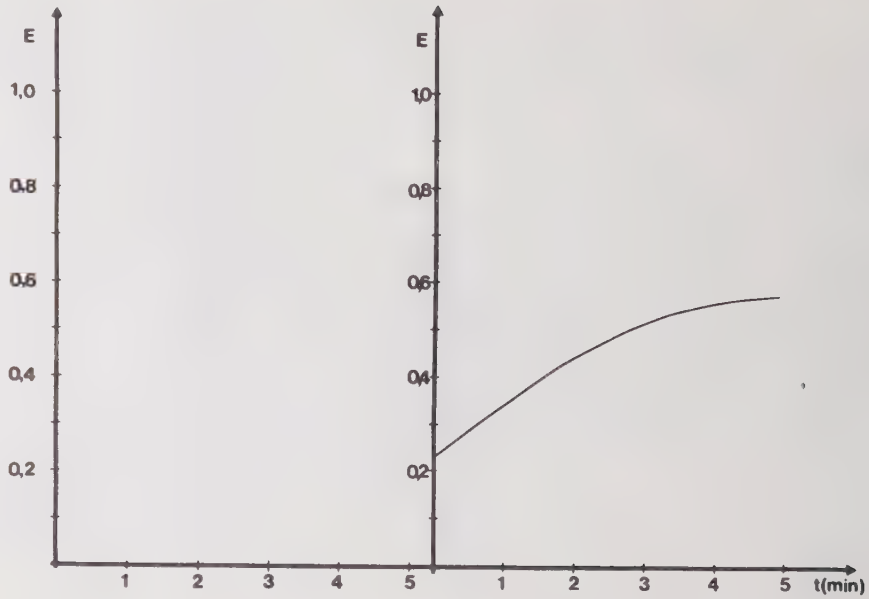


Abb.13: Extinktionsverlauf bei Verwendung von ß-Alanin- und Tris-Puffer
(links: ß-Alanin-Puffer, rechts: Tris-Puffer)

Substrat-Konz. mmol/ml	E/min. bei ß-Alanin-Konz. 1 M/l	o,5 M/l	o,o25 M/l
2,o	o,o76	o,o72	o,o56
1,o	o,o6o	o,o59	o,o54
o,5	o,o56	o,o43	o,o42
o,2	o,o2o	o,o22	o,o22
o,1	o,o1o	o,o12	o,o12

Ansatz: 2oo µl Puffer pH = 8,4
1oo µl Xa (= o,o71 nkat)
3oo µl Substrat

Tab.1o: Einfluß der ß-Alanin-Konzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit E/min.

Substrat-Konz. mmol/ml	E/min. bei Zusatz von Ca-Lactat zum ß-Alanin-Puffer o,o M/l	o,1 M/l	o,o5 M/l	o,o3 M/l	o,o25 M/l	o,o2 M/l	o,o125 M/l	o,o1 M/l
2,o	o,1o4	o,137	o,121	o,o86	o,125	o,1o1	o,o98	o,1oo
1,o	o,1o1	o,1o4	o,o97	o,o7o	o,1oo	o,o8o	o,o79	o,o7o
o,5	o,o78	o,o7o	o,o69	o,o5o	o,o71	o,o56	o,o57	o,o6o
o,2	o,o34	o,o35	o,o37	o,o25	o,o38	o,o3o	o,o31	o,o22
o,1	o,o16	o,o19	o,o21	o,o14	o,o21	o,o17	o,o17	o,o16

Ansatz: 2oo µl ß-Alanin-Puffer pH = 8,4
5o µl Ca-Lactat (bzw. destill. Wasser)
1oo µl Xa (= o,1 nkat)
3oo µl Substrat

Tab.11: Einfluß von Ca-Lactat-Zusatz zum ß-Alanin-Puffer auf die Reaktionsgeschwindigkeit E/min.

4.5.1. Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (km) der Wechselwirkung von FXa und S2222

Es wurden jeweils konstante Mengen Enzym mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen umgesetzt. Tab.11 zeigt die Meßergebnisse. In Abb.14 sind die Ergebnisse graphisch nach LINEWEAVER-BURK dargestellt. Die Messungen sind sehr gut reproduzierbar (Tab.12). Die graphische Ermittlung der km ergab einen Mittelwert von $9,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l bei einer Standardabweichung von o,16. Die rechnerische Ermittlung der km nach dem mathematischen Modell ergab einen Mittelwert von $5,4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l bei einer Standardabweichung von o,2. Bei allen Messungen wurden 1o-fach Bestimmungen durchgeführt. Aus Abb.14 ergibt sich ferner, daß sich die Maximalgeschwindigkeit Vmax proportional zur FXa-Aktivität verhält.

4.5.2. Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen FXa, Antithrombin III (ATIII) und S2222

Zunächst wurde eine konstante Menge FX mit jeweils einer konstanten Menge an ATIII und S2222 inkubiert.

Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die Extinktionsänderung pro Minute gemessen (Abb.15). Die graphische Darstellung zeigt eine Kurve, die annähernd einer e-Funktion entspricht. Die Inhibition durch ATIII ist nicht komplett, sondern sie nähert sich einer Restaktivität.
Zur Untersuchung der Wechselwirkung von FXa, ATIII und S2222 wurden jeweils konstante Mengen von FXa und ATIII mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen umgesetzt. Die Ergebnisse zeigt Tab.13a,b. Es wurden jeweils 6-fach Bestimmungen durchgeführt. Wie die Standardabweichungen zeigen, waren alle Messungen gut reproduzierbar. In Abb.16 sind die Meßergebnisse graphisch nach LINEWEAVER-BURK dargestellt. Sie zeigen, daß sich die maximale Geschwindigkeit Vmax umgekehrt proportional zur ATIII-Konzentration verhält. Aus der graphischen Darstellung wurde eine mittlere km von $6{,}8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l ± 0,9 ermittelt. Die rechnerische Bestimmung der km für die Wechselwirkung von FXa, ATIII und S2222 ergab einen Mittelwert von $5{,}1 \pm 1{,}2\ 10^{-4}$ Mol/l. Die Inhibition des FXa durch Antithrombin III erscheint somit vom nichtkompetitiven Typ.

4.5.3. Untersuchungen zur Wechselwirkung FX ATIII · Heparin S2222

Zunächst wurde jeweils eine konstante Menge Heparin mit konstanten Mengen ATIII, FXa und S2222 inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde die Extinktionszunahme pro Minute gemessen. Die Meßergebnisse sind in Abb. 17 graphisch dargestellt. Die Inhibition durch ATIII in Anwesenheit von Heparin läuft gleichsam in sekundenschnelle ab. Die Geschwindigkeit der Inhibition bei gegebener ATIII-, FXa- und S2222-Konzentration ist abhängig von der Heparinkonzentration. Die Inhibition des FXa durch ATIII und Heparin ist komplett.

Zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante für die Wechselwirkung von FXa, ATIII, Heparin und S2222 wurden konstante FXa-, ATIII- und Heparinmengen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen inkubiert und die Extinktionszunahme pro Minute gemessen (Tab.14a,b) In Tab.14a wurden nur 3 verschiedene Substratkonzentrationen benutzt, weil mit noch geringeren Konzentrationen keine meßbaren Umsätze erzielt werden konnten.

Die graphische Bestimmung der Km ergab einen Mittelwert von 8,5 $\pm$ o,33 · $1o^{-4}$ Mol/l. Die Berechnung der Km nach dem mathematischen Modell ergab über alle Messungen einen Wert von 8,2 $\pm$ 4,o4 · $1o^{-4}$ Mol/l, die Berechnung nur unter Verwendung der Messungen aus Tab.13 ergab einen Wert von 5,2 $\pm$ 1,33 · $1o^{-4}$ Mol/l. Wie die graphische Darstellung (Abb.18) zeigt, verhält sich die maximale Geschwindigkeit Vmax indirekt proportional zur Heparinkonzentration. Unter Zugrundelegung der Km, berechnet aus Tab.14a, scheint die Inhibition des FXa durch den ATIII-Heparin-Komplex dem nichtkompetitiven Typ zu entsprechen (siehe dazu Kap. 4.5.2.).

S2222 mmol/ml	E/min. [µmol · ml^{-1} · min.$^{-1}$] bei FXa-Konzentration [nkat/ml] o,71	o,47	o,35	o,2o	o,1o
1,22	o,624±o,o2	o,4o6±o,o2	o,3o2±o,o1	o,18o±o,oo3	o,o82±o,oo3
o,61	o,476±o,o2	o,313±o,oo9	o,217±o,oo4	o,133±o,ooo	o,o61±o,oo2
o,31	o,336±o,oo6	o,2o9±o,oo8	o,159±o,oo8	o,o93±o,oo3	o,o45±o,oo2
o,12	o,174±o,oo6	o,1o1±o,oo9	o,824±o,oo2	o,o49±o,oo1	o,o22±o,oo1
o,o6	o,o93±o,oo6	o,o6o±o,oo3	o,o42±o,oo1	o,o26±o,oo1	o,o12±o,ooo
km (graphisch)	8,9·1o^{-4}M/l	8,2·1o^{-4}M/l	9,8·1o^{-4}M/l	9,o·1o^{-4}M/l	1,o2·1o^{-4}M/l
km (rechnerisch)	5,48·1o^{-4}M/l	5,47·1o^{-4}M/l	5,48·1o^{-4}M/l	5,48·1o^{-4}M/l	5,o3·1o^{-4}M/l

n für alle Messungen = 1o

Tab.12: Wechselwirkung FXa - S2222

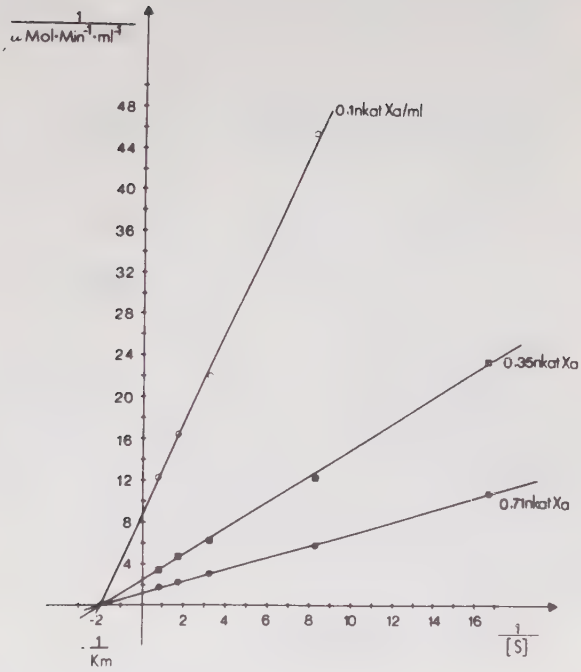


Abb.14:
Wechselwirkung F Xa - S2222

S2222 mmol/ml	Substratumsatz [µmol·ml^{-1}·min.$^{-1}$] bei ATIII-Konz. [U/ml]		
	o,o125	o,o25	o,o5
1,22	o,126±o,oo2	o,o89±o,o1o	o,o64±o,oo3
o,61	o,o88±o,oo4	o,o64±o,oo1	o,o45±o,oo4
o,31	o,o64±o,oo1	o,o35±o,oo1	o,o32±o,oo2
o,12	o,o37±o,oo6	o,o28±o,oo2	o,o2o±o,oo3
o,o6	o,o2o±o,oo2	o,o16±o,oo1	o,o11±o,oo1
km (graphisch)	6,5·1o^{-4}M/l	6,o·1o^{-4}M/l	5,7·1o^{-4}M/l
km (rechnerisch)	5,4·1o^{-4}M/l	7,o·1o^{-4}M/l	5,1·1o^{-4}M/l

FXa = o,2 nkat/ml
n für alle Messungen = 6

Tab.13a: Wechselwirkung FXa - ATIII - S2222

S2222 mmol/ml	Substratumsatz [µmol·ml^{-1}·min.$^{-1}$] bei ATIII-Konz. [U/ml] 0,025	0,05	0,1
1,22	0,216±0,008	0,112±0,006	0,050±0,003
0,61	0,186±0,006	0,091±0,003	0,039±0,001
0,31	0,140±0,003	0,066±0,002	0,029±0,000
0,12	0,075±0,002	0,028±0,003	0,014±0,01
0,06	0,040±0,001	0,019±0,006	0,000
km (graphisch)	6,7·10^{-4}M/l	7,1·10^{-4}M/l	8,5·10^{-4}M/l
km (rechnerisch)	3,1·10^{-4}M/l	4,5·10^{-4}M/l	5,6·10^{-4}M/l

FXa = 0,47 nkat/ml
n für alle Messungen = 6

Tab.13b: Wechselwirkung FXa - ATIII - S2222

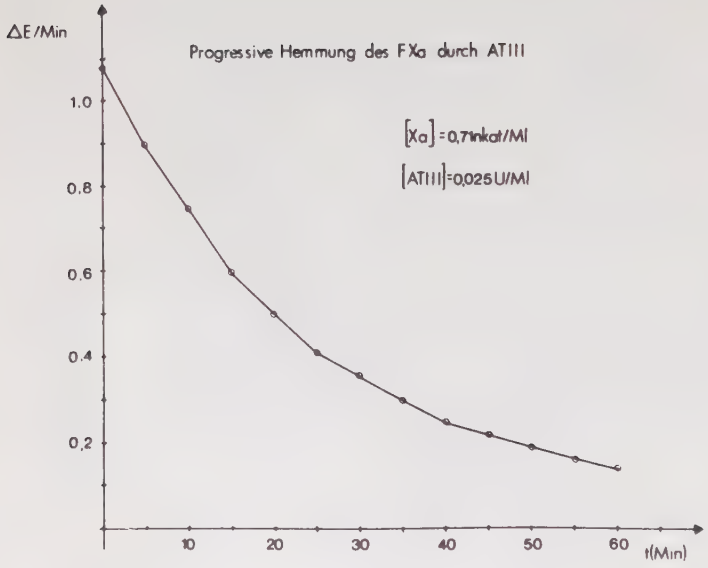


Abb.15:
Progressive Hemmung des F Xa durch AT III

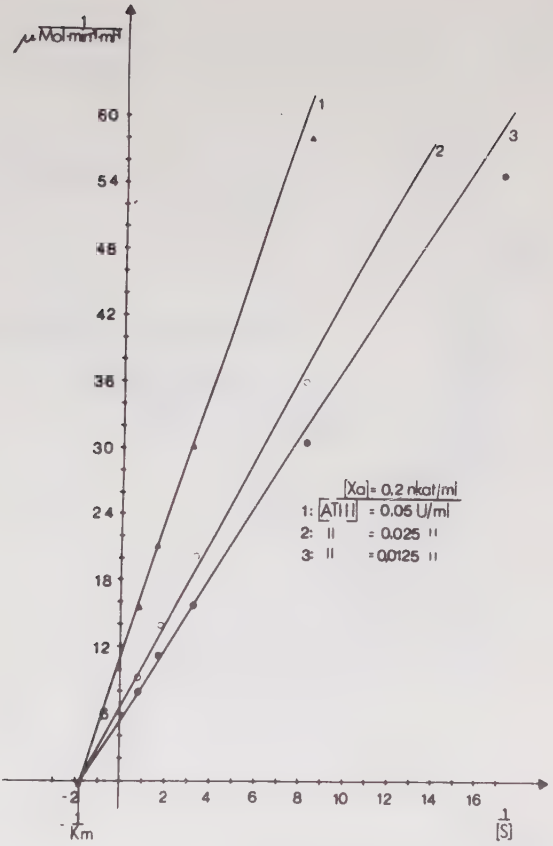


Abb.16:
Wechselwirkung F Xa - S2222 in Anwesenheit von AT III
(Darstellung nach LINEWEAVER-BURK)

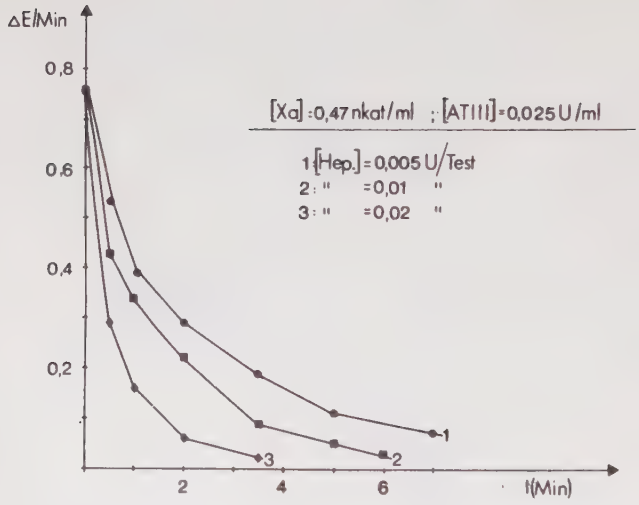


Abb.17:
Inhibitionsverlauf des F Xa durch AT III · Heparin

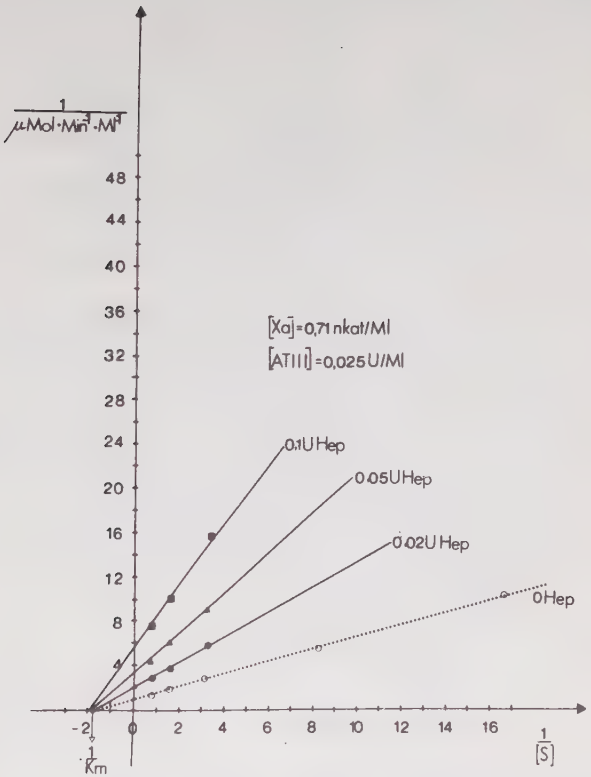


Abb.18:
Wechselwirkung F Xa - S2222 in Anwesenheit von AT III · Heparin .
(Darstellung nach LINEWEAVER-BURK)

S2222 mmol/ml	Substratumsatz [µmol·ml^{-1}·min.$^{-1}$] bei Heparin-Konz. [U/ml]		
	o,o2	o,o5	o,1
1,22	o,357±o,oo1	o,247±o,oo1	o,131±o,oo4
o,61	o,273±o,ooo	o,191±o,oo2	o,o99±o,ooo
o,31	o,171±o,ooo	o,11o±o,oo4	o,o44±o,oo3
o,12	o,348±o,oo1	o,o46±o,ooo	o,o21±o,oo1
o,o6	o,116±o,ooo	o,o24±o,oo1	o,ooo±o,ooo
km (graphisch)	8,3·1o^{-4}M/l	8,7·1o^{-4}M/l	8,3·1o^{-4}M/l
km (rechnerisch)	1o,3·1o^{-4}M/l	8,4·1o^{-4}M/l	15·1o^{-4}M/l

ATIII = o,o25 U/ml
FXa = o,71 nkat/ml
n für alle Messungen = 2

Tab.14b: Wechselwirkung FXa - [ATIII · Heparin] - S2222

S2222 mmol/ml	Substratumsatz µmol·ml^{-1}·min.$^{-1}$ bei Heparin-Konz. U/ml		
	o,oo5	o,o1	o,o2
1,22	o,3o5±o,oo4	o,233±o,oo2	o,133±o,oo8
o,61	o,245±o,oo2	o,189±o,oo4	o,1o2±o,ooo
o,31	o,168±o,ooo	o,131±o,oo6	o,o64±o,ooo
km (graphisch)	9,1·1o^{-4}M/l	8,3·1o^{-4}M/l	8,3·1o^{-4}M/l
km (rechnerisch)	4,5·1o^{-4}M/l	4,3·1o^{-4}M/l	6,7.1o^{-4}M/l

ATIII = o,o25 U/ml
FXa = o,47 nkat/ml
n für alle Messungen = 2

Tab.14a: Wechselwirkung FXa - [ATIII · Heparin] - S2222

4.6. Quantitativer Heparintest mittels Coatest

Nachdem in den vorausgegangenen Versuchen die Frage geklärt wurde, inwieweit das Kunstsubstrat S2222 den kinetischen Gesetzen gehorcht, wird im folgenden ein auf dem Markt befindliches Testsystem auf der Basis des chromogenen Substrates S2222 verwendet, um Heparin quantitativ zu bestimmen. Bei den Bestimmungen wurden die Laboranweisungen durch den Hersteller genau befolgt. Die Ergebnisse zeigt Tab.15. Schon die gemessenen Extinktionen der Leerwerte zeigen eine große Streuung. Diese Streuung findet sich dann zwangsläufig bei den einzelnen Heparin-Konzentrationen wieder. Die Einzelmessungen jedoch zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der Werte. In den Abb.19, 2o,21, sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Steigungen der Geraden zeigen teilweise erhebliche Abweichungen untereinander (Tab.15).

	Heparin	0,0 U/ml Hep. x	±s	0,2 U/ml Hep. x	±s	0,4 U/ml Hep. x	±s	0,6 U/ml Hep. x	±s	0,8 U/ml Hep. x	±s	Steigung der Geraden
1)	Mucosa-Hep.	0,833	0,02	0,694	0,002	0,488	0,030	0,352	0,004	0,262	0,010	-0,78
2)	Medac	0,851	0,02	0,720	0,007	0,591	0,005	0,443	0,010	0,370	0,006	-0,62
3)	Thrombophob	0,887	0,12	0,795	0,040	0,595	0,020	0,366	0,060	0,312	0,050	-0,87
4)	Liquemin	0,887	0,02	0,762	0,010	0,640	0,010	0,513	0,020	0,427	0,010	-0,59
5)	Braun-Mels.	0,922	0,03	0,780	0,030	0,653	0,020	0,502	0,020	0,456	0,010	-0,62
6)	Organon	0,922	0,03	0,776	0,030	0,604	0,020	0,480	0,020	0,361	0,020	-0,71
7)	Calciparin	0,833	0,02	0,728	0,020	0,576	0,020	0,422	0,010	0,335	0,010	-1,53
8)	Sandoz	0,840	0,01	0,786	0,006	0,714	0,020	0,599	0,008	0,505	0,008	-0,41
9)	Nordmark	0,823	0,01	0,660	0,020	0,480	0,006	0,366	0,003	0,276	0,010	-0,72
10)	Thromboliquine	0,823	0,01	0,786	0,008	0,714	0,005	0,631	0,007	0,537	0,010	-0,34
11)	Riker 20.000	0,833	0,02	0,539	0,010	0,398	0,020	0,287	0,010	0,203	0,010	-0,91

n für alle Messungen = 4

Tab.15: Ergebnisse Coatest^{R}

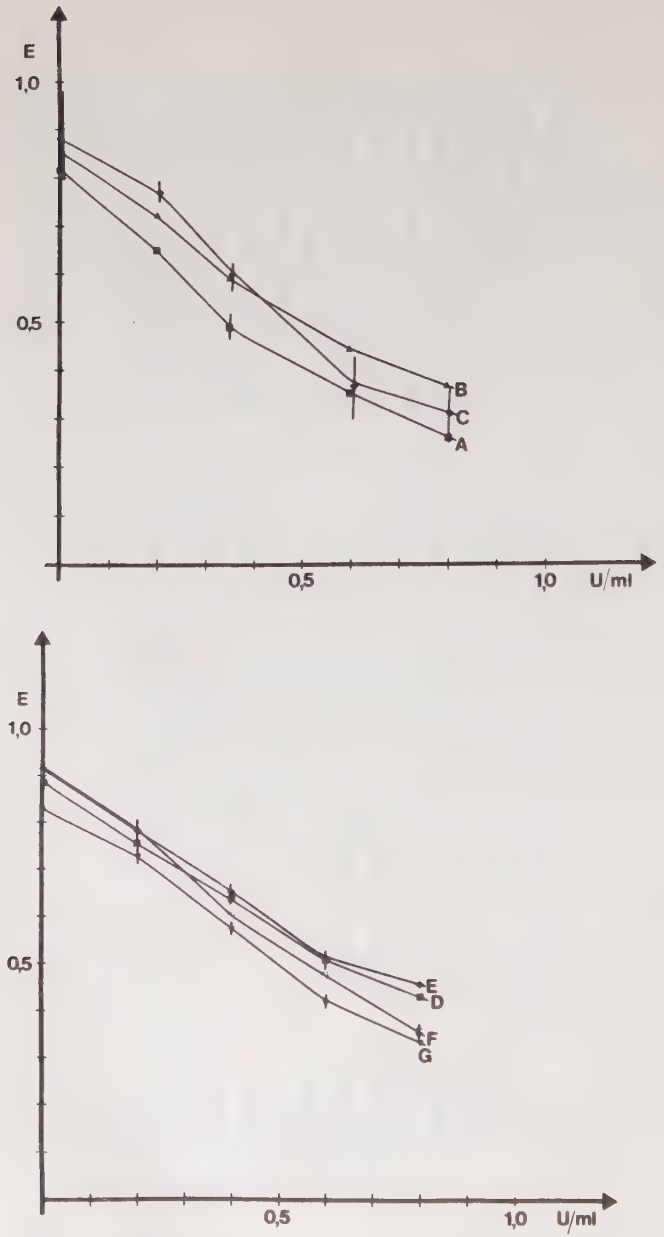


Abb.19,2o: Heparinbestimmung mittels Coatest^{R}
(Zuordnung der Buchstaben siehe S.93)

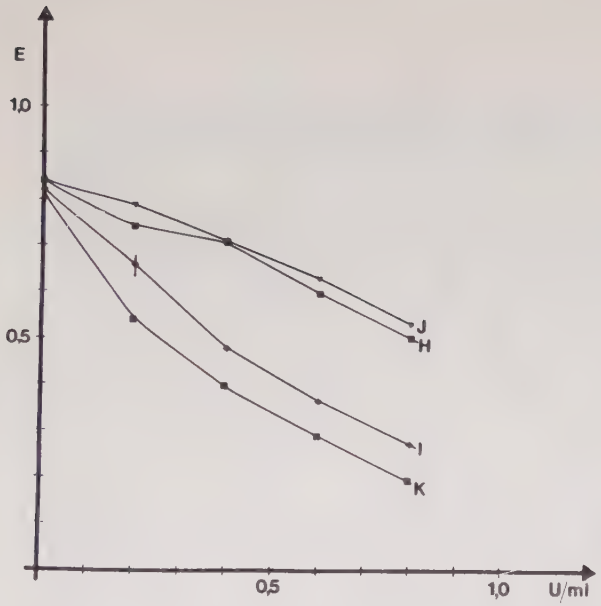


Abb.21: Heparinbestimmung mittels Coatest^{R}
A: Schweinemucosa Heparin
B: Heparin Medac^{R}
C: Heparin Thrombophob^{R}
D: Heparin Liquemin^{R}
E: Heparin Braun Melsungen
F: Heparin Organon
G: Heparin Calciparin^{R}
H: Heparin Dihydergot^{R}
I: Heparin Nordmark
J: Heparin Thromboliquine
K: Heparin Riker 2o.ooo

4.6.1. Untersuchung verschiedener Heparinfraktionen

Die physikochemischen Daten der Fraktionen sind in Tab.16 dargestellt. Tab.17 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen. Bei der Fraktion 0 werden höhere Extinktionen gemessen als bei den Fraktionen 1 - 3. Des weiteren fällt auf, daß die gemessenen Extinktionen der Fraktionen 1 und 3 fast identisch sind. Bei den Fraktionen 4 und 5 werden die höchsten Extinktionen gemessen. Die Ergebnisse der Fraktion 2 sind in sich widersprüchlich, denn im oberen Konzentrationsbereich (1o - 5 µl Heparin) zeigt sie die geringsten Extinktionen aller Heparine, im unteren Konzentrationsbereich (2,5 - 1,o µl Heparin) dagegen höhere Extinktionen als bei den Fraktionen 1 und 3. In Abb.22 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, besteht für alle Fraktionen keine eindeutige Korrelation zwischen Heparinkonzentration und Extinktion. Alle Kurven ähneln vielmehr einer e-Funktion.

Heparin-probe	Elementaranalyse Angaben in Gew.-%					Biologische Aktivität I.E./mg	pH-Wert	E_{260}	spezifischer Drehwert
	C	H	N	S	Na				
0	25,15	3,16	2,16	1o,98 (1o,9o)	1o,19	151,o	7,24	o,o55	+ 49,98°
1	26,37	3,51	2,17	1o,o5 (9,9o)	8,96	153,5	6,97	o,164	+ 48,74°
2	24,41	3,35	2,11	11,13 (11,67)	9,51	188,o	7,25	o,o33	+ 51,72°
3	24,79	3,45	2,17	11,o4 (11,oo)	1o,27	177,o	7,1o	o,o73	+ 52,41°
4	24,33	3,35	2,13	11,14 (11,5o)	1o,12	155,5	7,7o	o,o84	+ 52,45°
5	22,73	3,17	1,93	9,92 (1o,4o)	11,59	95,o	8,19	o,4o6	+ 46,42°

Alle Bestimmungen wurden bei der Fa. Braun Melsungen durchgeführt.

Tab.16: Physikalisch-chemische Daten von verschiedenen Heparin-Fraktionen (Sephadex G 1oo)

Heparinzugabe/ Testansatz µl	Fraktion 0 spez.Ak.151 U/mg E/min.	Fraktion 1 spez.Ak.153,5 U/mg E/min.	Fraktion 2 spez.Ak.188 U/mg E/min.	Fraktion 3 spez.Ak.177 U/mg E/min.	Fraktion 4 spez.Ak.155,5 U/mg E/min.	Fraktion 5 spez.Ak.95 U/mg E/min.
10,0	0,300±0,00	0,280±0,00	0,250±0,010	0,270±0,010	0,320±0,00	0,355±0,007
7,5	0,340±0,00	0,320±0,00	0,275±0,007	0,315±0,007	0,340±0,00	0,420±0,000
5,0	0,370±0,01	0,380±0,00	0,300±0,000	0,365±0,007	0,470±0,01	0,475±0,007
2,5	0,500±0,00	0,450±0,01	0,470±0,010	0,450±0,010	0,630±0,01	0,620±0,000
1,0	0,720±0,01	0,610±0,01	0,625±0,007	0,605±0,007	0,780±0,00	0,800±0,000

n für alle Messungen = 2

Tab.17: Untersuchungen verschiedener Heparinfraktionen

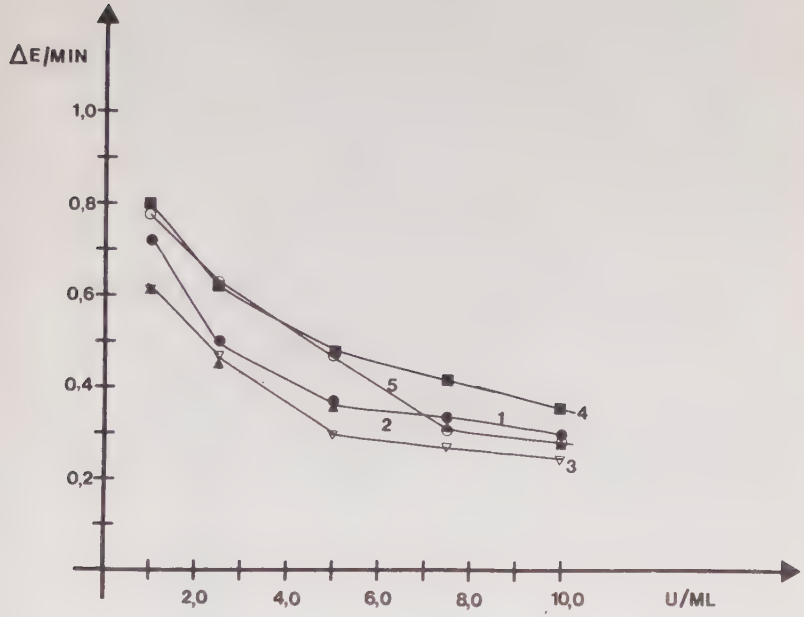


Abb.22: Untersuchungen verschiedener Heparinfraktionen

1 = Fraktion 0
2 = Fraktion 1 u. 3
3 = Fraktion 2
4 = Fraktion 3
5 = Fraktion 4
6 = Fraktion 5

4.6.2. Untersuchung verschiedener kommerzieller Heparine

Tab.18 zeigt die Ergebnisse. Die Heparine I und II stimmen in den gemessenen Extinktionen gut überein, ebenfalls das Heparin III, nur ist hier die Extinktion bei der untersten Heparinkonzentration wesentlich höher als bei den Heparinen I und II. Das Heparin IV zeigt die höchsten Extinktionen. Die niedrigsten Extinktionen zeigt das Heparin VII.
In Abb.23 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Daraus geht hervor, daß im Konzentrationsbereich von o,o1 U - o,1 U keine wesentliche Korrelation zwischen gemessener Extinktion/Minute und Heparinkonzentration besteht. In ihrem Verlauf ähneln die Kurven einer e-Funktion.

Heparin U/Testansatz	Medac^{R} E/min.	Dihydergot^{R} E/min.	Ca-Heparin Braun-Mels. E/min.	Liquemin^{R} E/min.	Roche E/min.	Organon^{R} E/min.	Riker E/min.
0,100	0,280±0,000	0,270±0,010	0,265±0,007	0,270±0,007	0,245±0,007	0,220±0,000	0,213±0,004
0,075	0,310±0,000	0,300±0,000	0,290±0,010	0,340±0,000	0,260±0,000	0,245±0,007	0,220±0,000
0,050	0,340±0,000	0,355±0,020	0,345±0,020	0,400±0,000	0,312±0,000	0,293±0,004	0,283±0,010
0,025	0,490±0,000	0,490±0,000	0,510±0,010	0,497±0,007	0,460±0,000	0,430±0,010	0,353±0,010
0,010	0,670±0,000	0,680±0,000	0,760±0,000	0,780±0,000	0,690±0,000	0,560±0,000	0,600±0,000
0,000	0,800	0,800	0,800	0,800			

n für alle Messungen = 2

Alle Messungen wurden an einem Tag durchgeführt.

Tab.18: Untersuchung kommerzieller Heparine

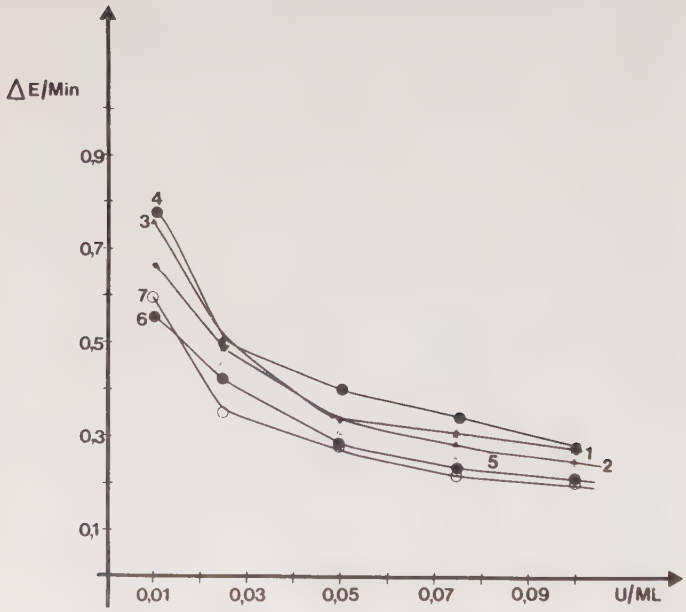


Abb.23: Untersuchungen verschiedener Heparine

1 = Heparin Medac^{R}
2 = Heparin Dihydergot^{R}
3 = Heparin Braun-Melsungen
4 = Liquemin^{R}
5 = Roche-Standardheparin
6 = Heparin-Organon^{R}
7 = Heparin Riker^{R}

5. DISKUSSION

Der erste Teil der Arbeit behandelt Untersuchungen zur physikochemischen Charakterisierung der Heparine. Die elektrophoretische Auftrennung der Heparine mittels Agarose-Elektrophorese zeigt neben der Inhomogenität der Heparinpräparate auch das Auftreten von Doppelbanden. Die elektrische Mobilität der einzelnen Präparate schwankt in einem Bereich von 3,02 - 3,51 $\left[\frac{cm}{V \cdot h}\right]$ Diese Inhomogenität ist einerseits auf unterschiedliche Ladungen, andererseits auf das nicht einheitliche Molekulargewicht der Heparine zurückzuführen. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (19) zeigen nur 2 Heparine Doppelbanden. Man kann das seltene Auftreten von Doppelbanden bei den untersuchten Heparinen wohl damit erklären, daß die heutigen Präparate einen höheren Reinheitsgrad aufweisen. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Coomassie-Brilliant-Blue^R-Färbung, mit der gezeigt werden konnte, daß die Präparate proteinfrei sind. Die Heterogenität der Heparine läßt sich mit der Methode der Isotachophorese noch deutlicher als mit der Elektrophorese aufzeichnen. Die Präparate Liquemin^R und Calciparin^R heben sich von den anderen insofern ab,

als bei ihnen das 2. Maximum größer als das erste ist. Die anderen Präparate verhalten sich genau gegenteilig. Das läßt den Schluß zu, daß diese beiden Präparate aus weniger saueren Heparinketten bestehen. Die beiden genannten Präparate zeigen auch in der Elektrophorese als einzige 2 Banden, ein Beweis dafür, daß es sich um weniger negativ geladene Heparine handelt. Die Isotachophorese zeigt weiterhin unterschiedliche Auftrennungsmuster verschiedener Chargen des gleichen Präparates. Diese unterschiedliche Zusammensetzung verschiedener Chargen ist eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, daß bei Applikation des gleichen Präparates die Wirkung bei gleicher Dosierung oft unterschiedlich ist. Nach dem Heparinpeak folgen bei allen Präparaten noch weitere kleinere Peaks. Bei ihnen dürfte es sich wohl um nicht näher zu bestimmende Verunreinigungen handeln. Somit ist gerade die Isotachophorese wegen ihrer hohen Empfindlichkeit eine ausgezeichnete Methode zur qualitativen Oberprüfung von Heparinen.
Die Na^+-, K^+- und Ca^{++}-Bestimmung der Heparine erbrachte, besonders was den Na^+-Gehalt anbetrifft, unterschiedliche Ergebnisse. Der Na^+-Gehalt der Heparine 1-8 entspricht der Konzentration des Serums. Die Heparine

9, 1o, 16, 17 weisen dagegen einen geringeren Na^+-Gehalt auf, bei gleichzeitig hohem Ca^{++}-Gehalt. Diese Präparate werden als calciumreiche Heparine vom Hersteller deklariert. Den höchsten Na^+-Gehalt weisen die Heparine 18, 19 und 23 auf. Bei diesen extrem hohen Na^+-Konzentrationen ist deswegen mit dem Auftreten von Schmerzen bei der subcutanen Applikation zu rechnen.

Die Ergebnisse der Heparin-Bausteinanalytik zeigen ein sehr konstantes S:C-Verhältnis. Pro Disaccharideinheit fanden sich maximal 2,3 Sulfatreste. Dieses steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden von ROSENBERG (35). Die Ergebnisse der Bausteinanalytik korrelieren jedoch nicht mit der Molekularmassenverteilung der Heparine (36). Das läßt folgenden Schluß zu:

1.) es existiert ein sogenannter kritischer Sulfatierungsgrad, das ist die minimale Estersulfatierung, die zur biologischen Aktivität nötig ist.

2.) nach Erreichen eines kritischen Estersulfatierungslevels in der Heparinkette kann keine Steigerung der biologischen Aktivität mehr erzielt werden.

Zu ähnlichen Befunden kommt auch SHAUBERGE bei seinen Untersuchungen (42).

Heparin bildet mit Toluidin-Blau einen metachromatischen Farbkomplex.
Oblicherweise wird der Farbkomplex bei 485 nm im Spektralphotometer gemessen. Wie jedoch aus Abb. 7 ersichtlich, wird bei dieser Wellenlänge das Maximum des Farbkomplexes von der Kurve des reinen Farbstoffs überlagert. Dieser Befund erklärt auch, warum es nicht möglich ist, mit Toluidin-Blau eine quantitative Heparinbestimmung durchzuführen. Bei dem Farbstoff "stains-all" ist keine solche Überlagerung zu beobachten. Deshalb ist es mit dieser Färbung möglich, in gewissen Grenzen eine quantitative Heparinbestimmung durchzuführen. Wie Abb. 9 zeigt, ist dieses in einem Konzentrationsbereich von 0 - 5 U/ml möglich. Wählt man den Konzentrationsbereich 5 U/ml, so ist das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht mehr erfüllt.
Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, mittels gerinnungsphysiologischer Methoden die Heparinaktivität zu bestimmen. Da die PTT eine häufig verwendete Methode zur Verlaufskontrolle der Heparintherapie ist, bietet

sie sich auch als Methode zur Bestimmung der Heparinaktivität an. In einem Konzentrationsbereich von o,2 - 1,4 U/ml besteht eine gute Korrelation zwischen Heparinkonzentration und gemessener Gerinnungszeit. Allerdings ist die Streuung der Messungen, besonders im oberen Konzentrationsbereich, groß. Wegen der mangelhaften Präzision und weil noch nicht einmal ein Konzentrationsbereich über 1 Dekade meßbar ist, ist diese Methode wenig geeignet um die Heparinaktivität zu bestimmen.

Die Thrombinzeitmethode zeigt ähnliche Ergebnisse. Auch hier zeigt sich in einem Konzentrationsbereich von o,2 - 1,4 U/ml eine positive Korrelation - bei ebenfalls großer Streuung der Einzelmessung, besonders im oberen Konzentrationsbereich. Die Streuung ist jedoch abhängig von der Thrombinkonzentration. Eine Erklärung dafür liegt im Zerfall und der Instabilität des Thrombins. Bei Verwendung einer optimalen Thrombinkonzentration eignet sich die Thrombinzeitmethode durchaus zur Bestimmung der Heparinaktivität. Im Vergleich der Thrombinzeitbestimmung im Koagulometer und optisch, zeigt erstaunlicherweise die optische Methode eine geringere Streuung der Messungen als die Methode

mittels Koagulometer. Bei der optischen Methode wurde der Konzentrationsbereich kleiner gewählt, da die langen Gerinnungszeiten oberhalb des gewählten Bereiches uns aus meßtechnischen Gründen nicht praktikabel erschienen. In jedem Fall eignet sich die Thrombinzeitbestimmung gut als Methode zur Standardisierung von Heparinen.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den chromogenen Peptidsubstraten. Die notwendigen Voruntersuchungen zur Ermittlung der pH- und Pufferoptima konnten die Wirksamkeit des vom Hersteller empfohlenen Puffers (21) nicht bestätigen, zumal ein optimales Puffersystem von großer Wichtigkeit ist, da es sich bei dem chromogenen Substrat S2222 um eine relativ sauere Substanz handelt. Wie wichtig aber eine gute pH-Konstanz für das Testsystem ist, zeigt Abb. 13: bei Verwendung eines Tris-Puffers ist kein linearer Extinktionsanstieg zu erzielen, wohl aber bei einem o,25 M ß-Alanin-Puffer. Die Ergebnisse der km-Bestimmung der ungehemmten Reaktion konnten die Messungen anderer Untersucher nicht bestätigen (44), die eine km von 3,5 - $1o^{-4}$ Mol/l fanden. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Konstanten könnte in der Berechnungsmethode liegen.

Auch bei unseren Messungen traten Unterschiede auf, je nachdem, ob die km grafisch oder rechnerisch ermittelt wurde (Tab.11). Da bei der grafischen Bestimmung die Reziprokwerte von s und v gegeneinander aufgetragen werden, bekommen kleine Substratkonzentrationen eine zu große Gewichtung, zumal bei kleiner Substratkonzentration die Meßgenauigkeit des Photometers abnimmt. Um genaue km-Werte zu erhalten, ist es empfehlenswert, die Michaelis-Konstante rechnerisch, d.h. mittels mathematischen Modells, zu ermitteln. Des weiteren ist für eine genaue km-Bestimmung die Testvorschrift genau zu beachten, das gilt besonders für die konstante Inkubationstemperatur. Nach unseren Untersuchungen führen schon Temperaturabweichungen von $\pm$ 1°C. zu einem Meßfehler von 1o%.
AT III hemmt F Xa progressiv in einem zeitabhängigen Verlauf. Der Kurvenverlauf, es handelt sich um eine e-Funktion, steht in guter Obereinstimmung mit den Befunden von ØDEGARD (38). ABILDGAARD (39) kommt dagegen zu einem anderen Ergebnis: die Inhibitionskurve entspricht einer Geraden. Die Erklärung dafür könnte möglicherweise in einer zu geringen AT-III-Konzentration des verwendeten Plasmas liegen. Ähnlich wie die km-

Bestimmung der ungehemmten Reaktion, so ergibt auch die km-Bestimmung der durch AT III gehemmten Reaktion unterschiedliche Werte, je nach verwendeter Methode. Die rechnerische Bestimmung ergibt einen Wert, der größer als die Michaelis-Menten-Konstante der ungehemmten Reaktion ist, die Berechnung der km durch das mathematische Modell bestätigt die km der ungehemmten Reaktion. Daraus ergeben sich völlig andere Inhibitionstypen: im ersten Fall entspricht die Hemmung des F Xa durch AT III dem unkompetitiven Typ, im zweiten Fall dem kompetitiven Typ. Bei der grafischen km-Bestimmung der gehemmten Reaktion kommt dem Problem der zu starken Gewichtung der kleinen Substratkonzentrationen eine noch größere Bedeutung zu.
Die Untersuchungen zum Inhibitionsverlauf des F Xa durch AT III in Anwesenheit von Heparin stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (16, 17, 38, 39) gut überein. Der Kurventyp wird durch die Zugabe von Heparin nicht verändert. Heparin hat nur Einfluß auf den Zeitverlauf der Inhibition: verläuft die Inhibition in Abwesenheit von Heparin nur sehr langsam, so läuft sie bei Zugabe von Heparin gleichsam in sekundenschnelle ab. Die molaren Konzentrationen von AT III und Heparin verhalten sich wie 1ooo:1. Das läßt den Schluß zu,

daß die Bindung des Heparins an das AT-III-Molekül reversibel ist, so daß ein Heparinmolekül mehrere AT-III-Moleküle aktivieren kann. Heparin kann nur einen aktivierenden Effekt ausüben, denn in Abwesenheit von AT III findet keine Hemmung statt (29). Somit kann man die Wirkung des Heparins auf die Inhibition des F Xa durch AT III mit der eines Katalysators gleichsetzen. Dafür sprechen auch thermodynamische Untersuchungen von YUE (41), der zeigen konnte, daß in Anwesenheit von Heparin die Aktivierungsenergie der Inhibitionsreaktion herabgesetzt wird.
Die Bestimmung der km der gehemmten Reaktion in Anwesenheit von Heparin ist in sich widersprüchlich: der Mittelwert aus allen Messungen ergibt einen Betrag von $8{,}5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, der aus nur einem Teil der Messungen (siehe Tab. 13a,b) einen Betrag von $5{,}2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l. Daraus ergibt sich zum einen eine Hemmung vom unkompetitiven Typ, zum anderen eine Hemmung vom kompetitiven Typ. Das würde für den ersten Fall bedeuten, daß Heparin den Hemmtyp verändert.
Den gleichen Befund erhob auch WOST (4o). Allerdings legte WOST bei seinen Untersuchungen die Anfangskinetik zugrunde, während es sich bei unseren Untersuchungen

um einen non-kompetitiven Ansatz bei kontinuierlicher Änderung des Systems handelt. Diese Tatsache könnte auch die widersprüchlichen Befunde erklären.
Basierend auf den oben gemachten Befunden wurde versucht, mittels eines im Handel befindlichen Tests einen quantitativen Heparintest aufzustellen. Nach Angaben anderer Untersucher (44) besteht in einem Konzentrationsbereich von o,2 - o,6 U/ml eine lineare Beziehung zwischen Heparinkonzentration und gemessener Extinktion. Unsere Untersuchungen konnten jedoch diesen Befund nicht in vollem Umfang bestätigen. Es fällt zunächst auf, daß die Messungen bei Abwesenheit von Heparin starken Schwankungen unterworfen sind. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden. Für den angegebenen Konzentrationsbereich ließ sich grafisch keine lineare Eichkurve erstellen; die Eichkurve entspricht vielmehr einer e-Funktion. Und diese e-Funktion entspricht auch den theoretischen Oberlegungen basierend auf einem mathematischen Modell von RICHTER (45). Die km wird von AT III nicht beeinflußt.

$$v = \frac{Vmax \cdot s}{km + s}$$

mit $Vmax = k_2 \cdot x_1$ (tink), wobei k_2 die Reaktionskonstante und x_1 die Konzentration an F Xa darstellt.

Für die Reaktionsbeschleunigung wird folgender Ansatz gemacht, der sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableiten läßt:

$$k_1 = k_{1o}^{(1xah)}$$

k_{1o} bezeichnet die Reaktionskonstante der Reaktion ohne Heparin und h die Heparinkonzentration. Damit besteht zwischen der Meßgröße Vmax und der zu bestimmenden Heparinkonzentration folgender Zusammenhang:

$$Vmax = \frac{k_2(x_{1o}-x_{2o})}{1-\frac{x_{2o}}{x_{1o}}e^{-k_{1o}^{-(1+ah)(x_{1o}-x_{2o})tink}}}$$

wobei x_{1o} und x_{2o} die Anfangskonzentration von FXa und ATIII darstellen. Und nur für sehr kleine Inkubationszeiten ist es möglich, den Exponentialterm zu linearisieren. Nach diesem Modell sind eigentlich experimentell ermittelte Eichgeraden unmöglich. Eine lineare

Kurve läßt sich nur erzielen, indem man diese berechnet. So ergeben sich dann Geraden unterschiedlicher Steigung. Das läßt den Schluß zu, daß die untersuchten Heparine eine unterschiedliche inhibitorische Potenz besitzen. Eine Tatsache, die auch bei der klinischen Anwendung bekannt ist. In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, zu wissen, wie sich die einzelnen Präparate in ihrer Molekulargewichtsverteilung zusammensetzen, zumal, da bekannt ist, daß die inhibitorische Potenz der Heparine von ihrem Molekulargewicht abhängig ist (46). Einen ähnlichen Schluß läßt auch Tab. 15 zu. Zunächst steigt die spezifische Aktivität mit abnehmendem Molekulargewicht - ab einer gewissen Molekülgröße nimmt sie dann wieder ab. Die Ergebnisse der Untersuchungen der einzelnen Fraktionen mittels chromogener Substrate zeigen, daß die anti-F-Xa-Potenz nicht zwangsläufig mit der spezifischen Aktivität positiv korreliert ist. Tab. 16 zeigt, daß anti-F-Xa-Potenz und Molekulargewicht sich genau umgekehrt verhalten wie spezifische Aktivität und Molekulargewicht, d.h., mit fallendem Molekulargewicht fällt zunächst die anti-F-Xa-Potenz,

um dann, ab einer gewissen Molekülgröße wieder anzusteigen. Eine Erklärung für diese Diskrepanz liegt höchstwahrscheinlich in der Bestimmungsmethode der spezifischen Aktivität mittels USP-Standard. Daraus folgt, daß eine Aktivitätsbestimmung der Heparine mittels USP-Standard keine oder nur geringe Aussagen über die anti-F-Xa-Aktivität der Heparine macht. Eine Tatsache, die je nach Verwendungszweck des Heparins zu berücksichtigen ist.

Was die Erstellung einer quantitativen Heparin-Aktivitätsbestimmung anbetrifft, so brachte auch eine Verbesserung des Testsystems keine eindeutige Verbesserung im Sinne einer linearisierbaren Eichkurve. Aufgrund des oben entwickelten theoretischen Modells kann auch eine solche Eichkurve nicht erzielt werden. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe zeigen jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede bei den einzelnen Heparinpräparaten. Zwei Erklärungen für diese Unterschiede sind möglich:

- entweder haben die untersuchten Heparine wirklich eine unterschiedliche inhibitorische Potenz,
- oder die angegebenen Konzentrationen stimmen nicht

mit den tatsächlich vorhandenen überein.
Was die zweite Möglichkeit anbetrifft, so ist auch hier zu berücksichtigen, daß üblicherweise die Konzentrationsbestimmung mittels USP-Standard erfolgt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Mit der Technik der Agarose-Elektrophorese konnte die Inhomogenität der einzelnen Heparinpräparate aufgezeichnet werden. Nur 2 Heparine zeigen Doppelbanden. Bei früheren Untersuchungen war die Zahl der Heparine mit Doppelbanden größer. Alle Heparine waren proteinfrei.

6.2. Besonders die Na-Bestimmung zeigte bei einigen Präparaten extrem hohe Werte, eine Tatsache, die bei der klinischen Anwendung zu berücksichtigen ist.

6.3. Es konnte weiter gezeigt werden, daß die Ergebnisse der Bausteinanalytik nicht unbedingt mit der Molekularmassenverteilung der Heparine korreliert. Das S:C-Verhältnis ist sehr konstant, so daß pro Disaccharideinheit höchstens 2,3 Sulfatreste vorhanden sein können.

6.4. Mit der Methode der Isotachophorese konnte die Heterogenität der Heparinpräparate noch deutlicher gemacht werden. Selbst unterschiedliche Chargen des gleichen

Präparates zeigen unterschiedliche Auftrennungsmuster. Des weiteren konnten mit dieser Methode in allen Präparaten Verunreinigungen aufgezeigt werden.

6.5. Heparin bildet mit Toluidin-Blau einen metachromatischen Farbkomplex. Eine quantitative Heparinbestimmung mittels Toluidin-Blau ist jedoch nicht möglich. Mit dem Farbstoff "stains-all" ist es jedoch möglich, in gewissen Grenzen eine quantitative Heparinbestimmung durchzuführen.

6.6. Die PTT ist keine geeignete Methode die Heparinaktivität zu bestimmen. Die Thrombinzeitmethode eignet sich bei Verwendung einer optimalen Thrombinkonzentration zur Bestimmung der Heparinaktivität - vor allem zur Standardisierung von Heparinpräparaten.

6.7. Bei den Voruntersuchungen zur Ermittlung der Testoptima für die Untersuchungen mittels chromogener Peptidsubstrate stellte sich ein o,25 ß-Alanin-Puffer als der beste heraus, da er in der Lage ist, den pH bei 8,4 konstant zu halten.

6.8. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen mittels chromogener Peptidsubstrate wurde gezeigt, wie wichtig die Bestimmungsmethode der km ist. Nur eine rechnerische Bestimmung liefert exakte Werte. Es konnte weiter gezeigt werden, daß die Hemmung von F Xa durch AT III progressiv und zeitabhängig ist. Die Hemmung scheint dem kompetitiven Typ zu entsprechen. In Anwesenheit von Heparin wird die Hemmung des F Xa durch AT III maximal beschleunigt. Heparin scheint den Hemmtyp nicht zu verändern. Es konnte gezeigt werden, daß die Wirkung des Heparins der eines Katalysators entspricht.

6.9. Die Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung von Heparin mittels des im Handel befindlichen Testsystems Coatest^{R} zeigten, daß keine lineare Beziehung zwischen Heparinkonzentration und gemessener Extinktion besteht.

6.1o. Die Ergebnisse der Untersuchungen einzelner Heparinfraktionen lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß die spezifische Aktivität dem Molekulargewicht in gewissen Grenzen indirekt proportional ist, daß

sich jedoch anti-F-Xa-Potenz und Molekulargewicht genau umgekehrt verhalten.

6.11. Auch mit einer Verbesserung des Testsystems konnte keine lineare Beziehung zwischen Heparinkonzentration und gemessener Extinktion gefunden werden. Die Beziehung entspricht einer e-Funktion.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1) HEIMBURGER,N.; TROBISCH,H.:
Blutgerinnung und Fibrinolyse
Ang. Chemie 3, 89 (1971)

2) MAMMEN,E.F.:
Physiology and biochemistry of blood-coagulation
In: BANG, KELTER, DEUTSCH, MAMMEN (Eds.):
Thrombosis and bleeding disorders
Academic Press, New York (1971), pp. 1

3) FELL,C.; IVANOVIC,N.; JOHNSON,S.A. und SEEGERS,W.H.:
Proc. Soc.
Exp. Biol. (New York) 85, 199 (1954)

4) MORAWITZ,P.:
Die Chemie der Blutgerinnung
Ergebn. Physiol. 4, 4o7 (19o5)

5) IVANOVIC,N.; SEEGERS,W.H.:
Differentiation of plasma antithrombin activities.
Proceedings of the Society of Experimental Biology
and Medicin 85, 199 (1954)

6) ABILDGAARD,U.:
Highly purified antithrombin III with heparin co-
factor activity prepared by disc electrophoresis
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, 89 (1968)

7) HEIMBURGER,N.:
First International Symposion on Tissue Factors
in Haemostasis of the Coagulation-Fibrinolysis
System
Florenz, Mai 1967, p. 353

8) PETERSEN,T.E.; DUDEK-WOJCIECHOWSKA,G.; SOTTRUP-JENSEN,L.; MAGNUSSON,S.:
The primary structure of antithrombin III
Thrombosis. Haemos. 38, 2o1 (1977)

9) ROSENBERG,R.D.; DAMUS,P.S.:
The purification and mechanisme of action of human antithrombin - heparin cofactor
J. Biol. Chem. 248, 649o (1973)

1o) YIN,E.T.; WESSLER,S.; STOLL,P.J.:
Identity of plasma activated factor V inhibiter with antithrombin III and heparin cofactor
J. Biol. Chem. 246, 3712 (1972)

11) ØSTERUD,B.; MILLER-ANDERSON,M.; ABILDGAARD,U.; PRYDZ,S.:
The effect of antithrombin III on the activity of the coagulation factors VII, IX, X
Thromb. Haemost. 35, 295 (1976)

12) OSAMO,
Evedence that antithrombin III and the inhibiter of activated Stuart-Prower factor are separate entities
Blut 23, 18o (1971)

13) ANDERSON,L.O.; BARROWCLIFF,T.W.; HOLMER,E.; JOHNSON,E.A.; SIMS,G.E.C.:
Anticoagulant propaties of heparins fractionated by affinity chromatography on matrix-bound anti-thrombin III and by gel filtration
Thromb. Res. 9, 575 (1976)

14) BARROWCLIFF,T.W.; JOHNSON,E.A.; EGGLETON,C.A.; DUNCON,P.T.:
Anticoagulant activities of lung and mucosa heparins
Thromb. Res. 12, 27 (1977)

15) "HAAGERS Handbuch der pharmazeutischen Praxis"
S. 1164

16) BIGGS,R.; DENSON,K.W.E.; ARKMAN,N.; BORRETT,R.; HADDEN,M.:
Antithrombin III, antifactor Xa and heparin
Brit. J. of Haem. 19, 283 (197o)

17) ROSENBERG,R.D.:
Biological action of heparin
Seminars in Haematology 14, Nr. 4 (1977)

18) VILLANUERA,G.B.; DANISHEFSKY,I.:
Evidence for a heparin-induced conformational change on antithrombin III
Biochem. Biophys. Res. Communications 74, 8o3 (1977)

19) JAQUES,L.B.; BALLIEUX,R.E.; DIETRICH,C.P.; KAVANAGH,L.W.
Can. J. Physiol. Pharmacol 46, 351 (1968)

2o) HAAG,D.; TSCHAHARGANE,C.T.; GOERTTLER,K.I.:
Simultanous differential staining of nucleic acids and proteins in histological tissues by means of I-Band effect
Histochemie 26, 19o (1971)

21) Laboranweisung für Heparin Coatest^{R}
AB Kabi, Stockholm, Sweden

22) MICHAELIS,L.; MENTEN,M.L.:
Biochem. Z. 49, 333 (1913)

23) BRIGGS,G.E.; HALDANE,J.B.S.:
Biochem. J. 19, 338 (1925)

24) Enzyme Nomenclature. Recommendations (1964) of the IUB
Elsevur Publishing Company, Amsterdam-London-New York (1965) S. 12

25) LINEWEAVER,H.; BURK,D.:
J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934)

26) EVERAERTS,F.M.; BECKERS,J.L.; VERHEGGEN,Th.P.E.M.:
Isotachophoresis, theory, instrumentation and application
Journal of Chromatography Library Volume 6 (1976)
Elsevur Scientific Publishing Company

27) KOHLRAUSCH,F.:
Ann. Phys., Leipzig 62, 2o9 (1897)

28) MAHONEY,W.C.; KURACHI,K.; HERMODSON,M.:
Mechanism of action of human antitrypsin and antithrombin III
Fed. Proc. 36, Abstr. Nr. 26o2 (1977)

29) SEEGERS,W.H.; COLE,E.R.; HARMSON,C.R.; MONKHOUSE,F.C.:
Neutralisation of autoprothrombin C activity with antithrombin
Can. J. Biochem. 42, 3o9 (1964)

3o) VENNERÖD,A.M.; LAAKE,K.; SOLBERG,A.K.; STRÖMLAND,S.:
Inactivation and binding of human plasma kallikrein by antithrombin III and heparin
Thromb. Res. 9, 457 (1976)

31) BURROWES,C.E.; HABAE,F.M.; MORAT,H.Z.:
The inhibition of human plasma kallikrein by antithrombin III
Thromb. Res. 7, 223 (1975)

32) VENNERÖD,A.M.; LAAKE,K.:
Inhibition of purified plasma kallikrein by antithrombin III and heparin
Thromb. Res. 7, 223 (1975)

33) OSTONE,D.; MURRAY,J.; CRAWFORD,G.P.D.:
Inhibition of the activated C1 subunit of the first component of complement by antithrombin III in the presence of heparin
Thromb. Res. 9, 217 (1976)

34) TELESFORO,P.; SEMERARO,N.; VERSTRAETE,M.; CALLEN,D.:
The inhibition of plasmin by antithrombin III-heparin complex in vitro in human plasma and during streptokinase therapy in man
Thromb. Res. 7, 669 (1975)

35) ROSENBERG,R.; LAM,L.H.:
Structural requirements for heparin's anti-coagulant function
Vortrag gehalten beim "International Symposium and Workshop on Structure, Biochemistry and Function of Antithrombin III", Homburg (Saar), 15. - 17.11.1979

36) ROSENBERG,R.:
The molecular interactions responsible for heparin's anticoagulant function
Vortrag gehalten beim "International Symposium and Workshop on Structure, Biochemistry and Function of Antithrombin III", Homburg (Saar), 15. - 17.11.1979

37) TROBISCH,H.; KLASING,K.-H.:
Zur Biochemie und Pharmakologie des Heparins
Deutsche Apothekerzeitung 34, 1587 (198o)

38) ØDEGARD,O.R.; ABILDGAARD,U.; LIE,M.; MILLER-ANDERSSON,M.:
Inactivation of bovine and human thrombin and factor Xa by antithrombin III studied with amidolytic methods
Thromb. Res. 11, 2o5-216 (1977)

39) ABILDGAARD,U.:
Antithrombin assays using chromogenic substrates
In: Chromogenic Peptide Substrates, M.F.SUCULLY; V.V.KAKKER (Eds.)
Churchill Livingstone, London, New York (1979) S. 171

4o) WOST,T.
Persönliche Mitteilungen

41) YU,R.H.; STARR,T.; GERTLER,M.M.:
Changes in the thermodynamic parameters in the inhibition of thrombin by bovine antithrombin III
VI. Int. Congr. Thromb. Haem.

42) SHAUBERGE,J.N.; GRUHL,M.; KITANI,T.; AMBEGAONKER,S.; KOMBAYASHI,J.; NAKAGAWA,M.; LENTER,D.:
Fractionated tritium-labelled heparin studied in vitro and in vivo.
Thromb. Res. 13, 767 (1978)

43) CLAESON,G.; AURELL,L.; KARLSSON,G.; GUSTAVSSON,S.; FRIBERGER,P.; ARIELLY,S.; SIMONSSON,R.:
Design of chromogenic peptide substrates
In: SCULLY,M.F.; KAKKER,V.V. (Eds.): Chromogenic peptide substrates
Churchill Livingston, London, New York 1978, S. 2o pp.

44) TEIEN,A.N.; LIE,M.; ABILDGAARD,U.:
Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated factor X
Thromb. Res. 8, 413 (1976)

45) RICHTER,O.
Persönliche Mitteilungen

46) JOHNSON,E.A.; KIRKWOOD,T.B.L.; STIRLING,Y.; PEREZ-REQUEGO,J.E.; INGRAM,G.I.C.; BANGHAM,D.R.; BROZOWIC,M.:
Four heparin preparations: Anti Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection
Thromb. Haem. 35, 586 (1976)

47) MAGNUSSON,S.
Persönliche Mitteilungen

48) OLIVIER,J.; BLOOM,F.; MAGIEU,C.:
On the origin of heparin
J. exp. Med. 86, 1o7 (1947)

49) JERPES,J.E.:
On heparin, its chemical nature and properties
Acta med. Scand. 88, 427 (1936)

5o) MAGNUSSON,S.; PETERSEN,T.E.; SOTTRUP-JENSEN,L.; CLAEYS,H.:
Complete primary structure of prothrombin
In: REICH, RIFKIN, SHAW: Proteases and biological control, pp. 123-149 (Cold Spring Horbor Laboratory, 1975)

51) WALZ,D.A.; SEEGERS,W.H.:
Amino acid sequence of human thrombin A chain
Biochem. biophys. Res. Commun. 6o, 717-722 (1974)

52) JOHNSON,E.A.:
Thrombos. Haemostas. 35, 586 (1976)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Trobisch danke ich für die Oberlassung des Themas und die zahlreichen Anregungen zur Bearbeitung des Themas.

Lebenslauf

3.8.5o	geboren als Sohn des Transportunternehmers Karl Klasing und seiner Ehefrau Gerda, geb. Schäfers.
1957-61	Katholische Volksschule, Bochum
1961-69	Graf-Engelbert Gymnasium, Bochum
WS 69/ SS72	Studium der Geschichte und Romanistik an der Universität Bochum
Studien- jahr 72/73	Studium der Medizin an der Universität Paris VI
1.11.73- 3o.8.74	Angestellter bei den Stahlwerken Bochum
WS 74	Studium an der Universität Bochum
SS 75- WS 8o	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf
Aug.76	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
Aug.77	Bestehen des 1. Teils der Ärztlichen Prüfung
Aug.79	Bestehen des 2. Teils der Ärztlichen Prüfung
25. 11.8o	Bestehen des 3. Teils der Ärztlichen Prüfung
1o.12.8o	Erlangen der Approbation als Arzt
2.1.81- 3o.9.81	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf
seit dem 1.1o.81	Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik des Klinikums Barmen, Wuppertal